



Universidad Autónoma
de Madrid

Facultad de Ciencias

Programa de Doctorado en Microbiología

Título de la tesis doctoral

**Aproximación clínica y experimental al impacto
de la multirresistencia en la bacteriemia por
*Pseudomonas aeruginosa***

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Raúl Recio Martínez

Bajo la dirección de:

Dr. Fernando Chaves Sánchez

Dr. Jaime Lora-Tamayo Morillo-Velarde

Madrid, 2020

La investigación presentada en esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la ayuda de la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD16/0016). Financiación del Plan Nacional de I+D+i y el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Subdirección General de Redes y Centros de Investigación cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional FEDER (*"A way to build Europe"*).

El doctorando ha disfrutado de una beca de Formación de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) durante la elaboración de la tesis doctoral para la realización de una estancia formativa en el Hospital Universitario Son Espases.

El doctorando ha sido beneficiario de un contrato Río Hortega (CM19/00229) de la convocatoria de 2019 de la Acción Estratégica en Salud (AES) concedido por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y el Ministerio de Ciencia e Innovación del gobierno de España.

A una persona admirable y extraordinaria, mi madre

“La selección natural, como veremos más adelante, es una fuerza siempre dispuesta a la acción y tan inconmensurablemente superior a los débiles esfuerzos del hombre, como las obras de la naturaleza lo son a las del arte”

Charles Darwin, El origen de las especies

AGRADECIMIENTOS

Cuando te enfrentas a un nuevo reto, a una nueva situación, tienes la extraña sensación de que todo parece inalcanzable. Pero si algo he aprendido durante esta larga travesía es que hacer las cosas con dedicación y perseverancia permite alcanzar metas por muy lejanas que parezcan. Y cuando llegas al final echas la vista atrás, tu historia, tus sueños, tus valores, todo lo que te llevó hasta allí y todas las personas que te acompañaron en esta aventura. Estas líneas son para dar las gracias a todos los que me han ayudado a hacer posible lo que parecía imposible.

Al Dr. Fernando Chaves, director de esta tesis doctoral y principal impulsor de este proyecto. Mi mentor en el apasionante mundo de la Microbiología Clínica. Porque sin ti esta tesis doctoral hoy no sería una realidad. Por creer y confiar en mí, por compartir conmigo tu pasión por nuestra profesión hasta hacerla mía, por haberme hecho crecer tanto personal como profesionalmente. Porque ha sido (y es) un enorme placer trabajar y aprender de ti cada día.

Al Dr. Jaime Lora-Tamayo, codirector de esta tesis doctoral y estímulo constante de este proyecto. Excelente internista del que tantas cosas he aprendido y (estoy seguro) me quedan por aprender. Por tu espíritu franco y rigor científico. Por acompañarme en esta senda de obstáculos estadísticos que me han traído de cabeza. En esta aventura, además, he ganado un gran amigo.

A la Dra. Marta Martín, por tu tutela durante estos años y por tu inestimable ayuda para organizar y preparar toda la documentación a presentar. Por tu pasión por las “Pseudomonas”.

Al Dr. Rafael Delgado, jefe del Servicio de Microbiología, por hacerme sentir parte del equipo desde el primer día. Por todas las enseñanzas, por los consejos, por las recomendaciones bibliográficas. No exagero al afirmar que si volviera a tomar este camino lo haría exactamente en este mismo lugar. Irremediablemente, y gracias a ti, llevo el sello del “12 de Octubre”.

Al resto de mis actuales compañeros que contribuyen a hacer inmejorable el ambiente del día a día. En especial (por orden alfabético) a Alhena, Gonzalo, Irene, Isa, Mamen, Marta, y Mikel, por hacerlo fácil. A Angelines, por ser torrente de vitalidad (tan necesaria a veces). A Esther, por dejarme en herencia este apasionante microorganismo. Y al resto de facultativos del Servicio: Alfredo, Ana, Jenny, Lola, Mari Ángeles, Mónica y Paula, por todo lo aprendido y lo vivido. Sois un ejemplo increíble de trabajo duro y dedicación, que el SARS-CoV-2 no pueda con vosotros.

A todo el personal técnico y administrativo del Servicio de Microbiología, por su excelente predisposición, por su ánimo de trabajo y su infinita paciencia. En especial (por orden alfabético) a Antonia, Esther, Mar y Merce, por hacer posible una parte importante de este trabajo. A Sonia y Marcos por esa complicidad que nos une y el “mamarrachismo”. Y a Ana y Paquiciencia por esa relación tan única (y casi “sesual”) que tenemos. Sin vosotros el laboratorio se caería.

A Maribel y Olga, por su alegría y los buenos momentos en el laboratorio. Por todas y cada una de las meriendas con espectáculo incluido. Sois únicas, no cambiéis nunca.

A todo el personal del Instituto y la Fundación de Investigación del Hospital 12 de Octubre. En especial (por orden alfabético) a Fátima, Paula y Sara, por vuestra ayuda incondicional. Al resto de los Servicios del Hospital 12 de Octubre que formáis también parte de todo esto.

Al Dr. Antonio Oliver, jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Son Espases, por acogerme en su grupo como uno más, por su cercanía. Mi gratitud y mi reconocimiento se hacen extensivas al resto de ese maravilloso equipo: Irina, Laura, Carlos, Carla, Pablo y Esther, por vuestra generosidad y amistad. Por muchos años más de fructífera colaboración.

Al Instituto de Salud Carlos III y al Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España, por otorgarme el contrato Río Hortega y permitirme así continuar formándome como facultativo especialista. Por invertir en investigación y en salud. A la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) y a la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI) por las ayudas concedidas y por su gran labor.

A mis amigos, esa familia que eliges y que son parte imprescindible de este capítulo para mis memorias (“de niña a mujer, mi romance secreto con Joselito”). En especial a Alen y Alberto, por cruzaros aquel día en mi vida, por hacerme reír tanto, por crecer conmigo, porque juntos todo es más fácil. A mis amigos de Talavera, por todos los momentos compartidos. A Lagoona (allá donde estés), mi fiel compañera de viaje. A Edu y Sandra, por los retoques finales. Y a todos los que me acompañáis en el camino y a los que os separasteis en las muchas bifurcaciones.

A mi familia (los que están y los que desgraciadamente se fueron) que ha hecho de mí la persona que hoy soy. A mis padres, José e Isabel, por todo su esfuerzo y la confianza depositada en mí desde el principio. Por estar siempre, por empujarme cuando lo he necesitado, por apoyarme en mis decisiones, por los consejos, por haberme educado para ser libre, por ser siempre mi ejemplo a seguir. A Óscar, porque no se puede tener un mejor hermano. A mis abuelos, tíos y primos, por cuidar de mí. He tenido la suerte de crecer con tanto cariño que ese es mi mejor tesoro.

Y a ti, Álvaro, mi mitad (la mejor que podría imaginar) en este camino. Por llegar un día y ponerlo todo “patas arriba”. Por coger mi mano y evolucionar juntos, por tener siempre una sonrisa, por escucharme, por quererme incluso en mi peor versión. Sin ti nada de esto hubiera sido posible.

Y, por último, a todos los pacientes, la razón y el motor de todo cuanto hacemos. Por luchar con valentía y firmeza. Por confiar en nosotros para seguir avanzando juntos.

ÍNDICE GENERAL

PRESENTACIÓN	31
RESUMEN	35
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	39
1. Publicaciones en revistas científicas indexadas	41
2. Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales	41
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	43
INTRODUCCIÓN	47
1. Características generales de <i>P. aeruginosa</i>	49
2. Determinantes de patogenicidad y virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	51
2.1. Determinantes de virulencia en infecciones agudas.....	52
2.1.1. Adhesión y colonización tisular	52
2.1.2. Invasión y destrucción tisular local	53
2.1.3. Diseminación y respuesta sistémica	56
2.2. Determinantes de virulencia en infecciones crónicas.....	57
2.2.1. Sistema sensor de densidad de población (<i>quorum sensing</i>)	57
2.2.2. Formación de <i>biofilms</i>	57
2.2.3. Mecanismos adaptativos en infecciones crónicas	57
3. Mecanismos de resistencia antibiótica en <i>P. aeruginosa</i>	58
3.1. Mecanismos de resistencia intrínseca (resistoma intrínseco)	58
3.1.1. Baja permeabilidad de la membrana	59
3.1.2. Producción constitutiva o inducible de bombas de expulsión activa	59
3.1.3. Expresión de β -lactamasa cromosómica inducible AmpC	59
3.2. Mecanismos de resistencia adquirida (resistoma adquirido)	60
3.2.1. Mutaciones en genes cromosómicos	61
3.2.2. Adquisición de determinantes de resistencia por transferencia horizontal.....	62
4. Importancia clínica de <i>P. aeruginosa</i>	65
5. Bacteriemia por <i>P. aeruginosa</i>	66
5.1. Epidemiología.....	66
5.2. Factores de riesgo y origen de la bacteriemia	67
5.3. Patogénesis y respuesta del huésped	68
5.4. Presentación clínica.....	68
5.5. Tratamiento antibiótico	69
5.5.1. Principios generales del tratamiento antibiótico	69
5.5.2. Tratamiento antibiótico empírico	71
5.5.3. Tratamiento antibiótico dirigido	72
5.6. Mortalidad y factores pronósticos	73

5.6.1. Factores relacionados con el huésped	73
5.6.2. Factores relacionados con el microorganismo.....	74
5.6.3. Factores relacionados con el tratamiento antibiótico	74
6. Multirresistencia en <i>P. aeruginosa</i>	75
6.1. Situación actual y gravedad del problema	75
6.2. Clones epidémicos de alto riesgo.....	77
6.2.1. Caracterización de los clones de alto riesgo	77
6.2.2. Determinantes asociados a los clones de alto riesgo	78
6.2.3. Epidemiología de los clones de alto riesgo	78
6.3. Evolución de la multirresistencia en el Hospital Universitario 12 de Octubre.....	79
6.4. Impacto clínico de la multirresistencia.....	80
6.5. Multirresistencia frente a coste biológico.....	81
7. Estudios experimentales de virulencia en <i>P. aeruginosa</i>.....	82
7.1. Justificación del uso de estudios experimentales	82
7.2. <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo animal de infección	83
JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	85
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	89
MATERIAL Y MÉTODOS	93
1. Investigación clínica.....	95
1.1. Ámbito de estudio.....	95
1.2. Diseño de los estudios.....	95
1.2.1. Diseño del primer estudio retrospectivo piloto (2016).....	96
1.2.2. Diseño del segundo estudio retrospectivo (2013-2017).....	96
1.3. Variables de los estudios.....	97
1.3.1. Variables epidemiológicas.....	97
1.3.2. Variables clínicas	97
1.4. Definiciones empleadas	98
1.5. Estudios microbiológicos y moleculares	102
1.5.1. Procesamiento de los hemocultivos	102
1.5.2. Identificación de las cepas bacterianas.....	102
1.5.3. Conservación de las cepas bacterianas	103
1.5.4. Estudios de sensibilidad antibiótica	103
1.5.5. Caracterización de la producción de carbapenemasas.....	104
1.5.6. Análisis de la estructura poblacional.....	106
1.5.7. Genotipo del sistema de secreción tipo III.....	109
1.5.8. Serotipo del antígeno O	109

1.6. Análisis estadístico	109
1.7. Aspectos éticos.....	110
2. Investigación experimental	111
2.1. Ámbito de estudio	111
2.2. Diseño de los estudios.....	111
2.2.1. Selección de las cepas bacterianas	112
2.3. Ensayos de citotoxicidad celular	114
2.3.1. Cultivo celular.....	114
2.3.2. Preparación de los inóculos bacterianos.....	114
2.3.3. Evaluación de la respuesta citotóxica: determinación de lactato deshidrogenasa (LDH).....	115
2.4. Ensayos de letalidad con <i>C. elegans</i>	116
2.4.1. Preparación de <i>C. elegans</i>	116
2.4.2. Preparación de las cepas bacterianas	117
2.4.3. Realización de los ensayos de virulencia.....	117
2.5. Análisis estadístico	118
2.6. Aspectos éticos.....	118
RESULTADOS.....	119
1. Características clínico-epidemiológicas de la bacteriemia por <i>P. aeruginosa</i>	121
1.1. Descripción de la cohorte global.....	121
1.2. Incidencia	122
1.3. Características epidemiológicas	123
1.4. Características clínicas.....	124
1.5. Tratamiento antibiótico empírico y control del foco	126
2. Características microbiológicas de la bacteriemia por <i>P. aeruginosa</i>	127
2.1. Fenotipo de resistencia	127
2.2. Caracterización molecular de carbapenemasas.....	129
2.3. Estructura poblacional de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente.....	130
2.4. Evolución de la multirresistencia a lo largo del tiempo	134
2.5. Genotipo del sistema de secreción tipo III.....	135
2.6. Serotipo del antígeno O	135
2.7. Tiempo de positividad del hemocultivo	136
3. Impacto clínico de la multirresistencia de <i>P. aeruginosa</i>	138
3.1. Impacto global del fenotipo MDR	138
3.2. Impacto global de los clones de alto riesgo ST175 y ST235	141
4. Impacto clínico de la virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	145

4.1. Impacto global del genotipo <i>exoU</i> ⁺	145
4.2. Impacto global del serotipo O11	148
4.3. Asociación entre la multirresistencia y la virulencia	151
5. Mortalidad de la bacteriemia por <i>P. aeruginosa</i>	153
5.1. Evolución de la mortalidad a lo largo del tiempo	153
5.2. Análisis univariante de la mortalidad precoz y tardía	153
5.3. Análisis estratificado de la mortalidad según la multirresistencia.....	156
5.4. Tasa de mortalidad según el tiempo de positividad de los hemocultivos	157
5.5. Análisis multivariante de la mortalidad precoz y tardía.....	158
6. Virulencia de <i>P. aeruginosa</i> en modelos experimentales	160
6.1. Descripción de las cepas bacterianas.....	160
6.2. Impacto del fenotipo MDR en la virulencia.....	167
6.3. Impacto de los clones de alto riesgo ST175 y ST235 en la virulencia	168
6.4. Impacto del genotipo <i>exoU</i> ⁺ en la virulencia	170
6.5. Impacto del serotipo O11 en la virulencia	172
6.6. Asociación entre la multirresistencia y la virulencia en el modelo de <i>C. elegans</i>	173
DISCUSIÓN	175
CONCLUSIONES	193
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	197
ANEXOS	223
Anexo 1. Publicaciones en revistas científicas indexadas	225
Anexo 2. Formularios de recogida de datos de los estudios	254
Anexo 3. Informe favorable de la Comisión de Investigación	256

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales determinantes de virulencia en infecciones agudas por <i>P. aeruginosa</i>	52
Tabla 2. Principales mecanismos de resistencia adquirida en <i>P. aeruginosa</i>	60
Tabla 3. Clasificación e hidrólisis de las carbapenemasas en <i>P. aeruginosa</i>	62
Tabla 4. Categorías de antibióticos activos frente a <i>P. aeruginosa</i>	75
Tabla 5. Criterios de Friedman.....	98
Tabla 6. Índice de comorbilidad de Charlson.....	99
Tabla 7. Índice de bacteriemia de Pitt.....	100
Tabla 8. Definiciones de sepsis y shock séptico.	100
Tabla 9. Antibióticos analizados y puntos de corte de sensibilidad utilizados (EUCAST v.8.1.)	103
Tabla 10. <i>Primers</i> y condiciones empleadas para la caracterización de carbapenemasas.....	105
Tabla 11. <i>Primers</i> y condiciones empleadas para el MLST de <i>P. aeruginosa</i>	108
Tabla 12. <i>Primers</i> y condiciones empleadas para la caracterización del genotipo del SST3... .	109
Tabla 13. Cepas bacterianas incluidas en los estudios experimentales.....	112
Tabla 14. <i>Caenorhabditis elegans</i> Virulence Scoring (CEVS).	117
Tabla 15. Incidencia anual de bacteriemia por <i>P. aeruginosa</i> por cada 100.000 estancia-año	122
Tabla 16. Características epidemiológicas basales de la cohorte global.....	123
Tabla 17. Características clínicas de los episodios de bacteriemia por <i>P. aeruginosa</i>	125
Tabla 18. Características microbiológicas de las cepas de <i>P. aeruginosa</i>	127
Tabla 19. Patrón de sensibilidad antibiótica de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i>	128
Tabla 20. Esquema MLST de los clones mayoritarios de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente.....	133
Tabla 21. Fenotipo de resistencia de los clones de alto riesgo ST175 y ST235.....	134
Tabla 22. Distribución de los serotipos del antígeno O en aislamientos de <i>P. aeruginosa</i>	136
Tabla 23. Comparación de los episodios de bacteriemia según el fenotipo de resistencia.....	138
Tabla 24. Comparación de los episodios de bacteriemia según los clones de alto riesgo.....	141
Tabla 25. Comparación de los episodios de bacteriemia en función del genotipo <i>exoU</i>	145
Tabla 26. Comparación de los episodios de bacteriemia en función del serotipo O11.....	148
Tabla 27. Análisis univariante de predictores de mortalidad global precoz y tardía.....	154
Tabla 28. Análisis multivariante de predictores de mortalidad global precoz y tardía.....	159
Tabla 29. Resultados de los ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	162
Tabla 30. Características microbiológicas de <i>P. aeruginosa</i> según la virulencia en <i>C. elegans</i> .	173
Tabla 31. Opciones terapéuticas sugeridas según los perfiles de resistencia.....	182
Tabla 32. Características de los tres principales clones de alto riesgo de <i>P. aeruginosa</i>	189

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colonias de <i>P. aeruginosa</i> . Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> en agar sangre (a). Producción de diferentes pigmentos de <i>P. aeruginosa</i> en agar Müller-Hinton (b).....	49
Figura 2. Determinantes de patogenicidad y virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	51
Figura 3. Estructura del sistema de secreción tipo III de <i>P. aeruginosa</i>	54
Figura 4. Mecanismos de resistencia en <i>P. aeruginosa</i>	58
Figura 5. Elección del tratamiento antibiótico empírico activo frente a <i>P. aeruginosa</i> . (a) Alta carga bacteriana no corregible quirúrgicamente (neumonía extensa o con cavitación); (b) Incluye neutropenia <500 células/mm ³ y tratamiento con dosis de corticoides > 20 mg/Kg > 3 semanas; (c) Tratamiento en los últimos 30-90 días con un β -lactámico activo contra <i>P. aeruginosa</i> , ingreso durante > 3-5 días en una unidad de hospitalización con una prevalencia de cepas multirresistentes >10-20% o historia previa de colonización/infección por <i>P. aeruginosa</i> multirresistente; (d) Dosis de carga inicial seguida de altas dosis administradas como infusión continua (o prolongada) durante las primeras 48-72 horas; (e) Según epidemiología local y la sensibilidad de posibles aislamientos previos; (f) Monoterapia en caso de infección del tracto urinario o infección del catéter venoso. Asociación con amikacina o ciprofloxacino en situaciones con alta carga bacteriana (neumonía); (g) Ciprofloxacino como tratamiento de elección para otitis externa maligna, prostatitis e infección bronquial en pacientes con fibrosis quística.....	71
Figura 6. Factores que contribuyen en la mortalidad de las infecciones por <i>P. aeruginosa</i>	73
Figura 7. Distribución de aislados de <i>P. aeruginosa</i> resistentes por países de la UE/EEE en 2017. Resistencia combinada a tres o más de los antimicrobianos.....	76
Figura 8. Evolución de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente en el Hospital 12 de Octubre.	79
Figura 9. Ciclo biológico de <i>C. elegans</i> . El tiempo 0 se considera el momento de la fertilización. Los números azules en las flechas indican el tiempo que el nematodo se encuentra en cada estadio. La longitud del animal en cada estadio se indica en μ m.....	83
Figura 10. Mecanismos de letalidad en <i>C. elegans</i> por <i>P. aeruginosa</i>	84
Figura 11. Diseño y periodo de la investigación clínica.	96
Figura 12. Esquema de funcionamiento del MALDI-TOF.	102
Figura 13. Diseño y periodo de la investigación experimental.	112
Figura 14. Protocolo de preparación del ensayo de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> en <i>C. elegans</i>	116
Figura 15. Proceso de inclusión de los episodios de bacteriemia por <i>P. aeruginosa</i>	121
Figura 16. Porcentaje de aislamientos e incidencia anual de bacteriemia por <i>P. aeruginosa</i>	122
Figura 17. Detección de carbapenemasas por PCR en aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente. Se presenta el gel de agarosa al 1% de la PCR del gen <i>bla</i> _{GES} . M: marcador de peso molecular (Φ X174 DNA-Digest); carreras 1,2,3,5,6,7,8,9,10 y 11: detección positiva del gen <i>bla</i> _{GES} ; carrera 4: detección negativa del gen <i>bla</i> _{GES} ; carrera 12: control positivo; carrera 13: control negativo.	129
Figura 18. PFGE de aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente pertenecientes a los clones mayoritarios A y B. Se presentan los geles de agarosa de PFGE del clon A (a) y clon B (b). M: marcador de peso molecular (<i>lambda ladder</i> PFGE). (a) carreras 1-7: aislamientos pertenecientes al clon A; carrera 8: aislamiento perteneciente a clon no A. (b) carreras 1-4 y 8-	

13: aislamientos pertenecientes al clon B; carreras 5-7: aislamientos pertenecientes a clones no B.....	130
Figura 19. Dendograma y principales características de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente representativas del clon A. ECP: electroforesis en gel de campo pulsado; TC: tipo de carbapenemasa; IPI: E-test MBL; ST: secuencia tipo.....	131
Figura 20. Dendograma y principales características de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente representativas del clon B. ECP: electroforesis en gel de campo pulsado; TC: tipo de carbapenemasa; IPI: E-test MBL; ST: secuencia tipo.....	132
Figura 21. Evolución de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente durante el periodo de estudio.	134
Figura 22. Detección del gen <i>exoU</i> por PCR en aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> . Se presentan el gel de agarosa al 1% de la PCR del gen <i>exoU</i> . M: marcador de peso molecular (ΦX174 DNA-Digest). Carreras 1, 3, 4, 6,7, 8, 11, 12: detección positiva del gen <i>exoU</i> ; carreras 2, 5, 9 y 10: detección negativa del gen <i>exoU</i> ; carrera 13: control positivo; carrera 14: control negativo.	135
Figura 23. Aglutinación con antiseros específicos del antígeno O de <i>P. aeruginosa</i>	135
Figura 24. Distribución del tiempo de positividad de los hemocultivos de <i>P. aeruginosa</i>	137
Figura 25. Comparación de las curvas Kaplan-Meier de supervivencia global acumulada a 5 días (a) y a 30 días (b) tras el episodio de bacteriemia en función del fenotipo de resistencia.	141
Figura 26. Comparación de las curvas Kaplan-Meier de supervivencia global acumulada a 5 días (a) y a 30 días (b) tras el episodio de bacteriemia en función de los clones multirresistentes de alto riesgo.....	144
Figura 27. Comparación de las curvas Kaplan-Meier de supervivencia global acumulada a 5 días (a) y a 30 días (b) tras el episodio de bacteriemia en función del genotipo <i>exoU</i>	147
Figura 29. Diversidad de factores clínicos y bacterianos según el serotipo del antígeno O. La proporción de aislamientos para cada variable se indica en el gráfico de barras. La significación estadística ($P<0.05$) por test de χ^2 está representada por barras y números de colores (rojo, más prevalente; azul, menos prevalente). MDR: multirresistente; NT: no tipable.....	152
Figura 30. Evolución anual de la mortalidad global precoz y tardía de los episodios de bacteriemia.	153
Figura 31. Comparación de las curvas Kaplan Meier de supervivencia global acumulada a 30 días en la cohorte <i>exoU</i> ⁺ y <i>exoU</i> ⁻ en función del fenotipo de resistencia MDR (a) y no MDR (b). ...	156
Figura 32. Comparación de las curvas Kaplan Meier de supervivencia global acumulada a 30 días en la cohorte O11 y no O11 en función del fenotipo de resistencia MDR (a) y no MDR (b). ...	157
Figura 33. Relación entre la mortalidad y el tiempo hasta positividad del hemocultivo. La asociación estadística se llevó a cabo con el test de Mantle-Haenszel para tendencias lineales de mortalidad precoz (barras negras, $P=0.006$) y mortalidad tardía (barras grises, $P=0.010$).	158
Figura 34. Efecto de cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i> en los ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	160
Figura 35. Citotoxicidad sobre cultivos de células A549 de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> estudiadas. Se indican los resultados de cada cepa en color negro. Las cepas de referencia PAO1 y PA14 se incluyeron con fines comparativos. Los valores son medias \pm desviaciones estándar de al menos tres pocillos de tres placas independientes.	165
Figura 36. Dinámica de letalidad/multiplicidad de <i>C. elegans</i> en presencia de aislamientos invasivos de <i>P. aeruginosa</i> . Los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> se clasificaron en 5 niveles de	

virulencia (CEVS 1-5) dependiendo del efecto sobre la viabilidad de los nematodos, y cada uno se indica con un color diferente. Se incluyen dos niveles (CEVS 1-2) en los que las cepas se consideraron no virulentas (viabilidad del nematodo) y tres niveles (CEVS 3-5) de virulencia (letalidad del nematodo)..... 166

Figura 37. Frecuencia de cada categoría de CEVS entre los aislados invasivos de *P. aeruginosa*. Los aislamientos de *P. aeruginosa* se clasificaron en 5 niveles de virulencia (CEVS 1-5) dependiendo del efecto sobre la viabilidad de los nematodos, y cada uno se indica con un color diferente. Se incluyen dos niveles (CEVS 1-2) en los que las cepas se consideraron no virulentas (viabilidad del nematodo) y tres niveles (CEVS 3-5) de virulencia (letalidad del nematodo). Se indican los números absolutos..... 166

Figura 38. Citotoxicidad sobre cultivos de células A549 en función del fenotipo de resistencia. Se indican los resultados tras 3 horas de infección (MOI de 100). Los valores son medias \pm desviaciones estándar de al menos tres pocillos de tres placas independientes. Los valores medios que son significativamente diferentes se indican mediante barras y asteriscos: *, $P < 0.05$ 167

Figura 39. Score de virulencia de *C. elegans* (CEVS) en función del fenotipo de resistencia. Las cepas no virulentas (CEVS 1 a 2) se muestran en tonos morado y azul y las cepas virulentas (CEVS 3 a 5) se muestran en tonos amarillo, naranja y rojo. Los valores que son significativamente diferentes se indican mediante asteriscos: *, menor virulencia ($P < 0.05$); **, mayor virulencia ($P < 0.05$). 167

Figura 40. Citotoxicidad sobre cultivos de células A549 en función de la clonalidad. Se indican los resultados tras 3 horas de infección (MOI de 100). Los valores son medias \pm desviaciones estándar de al menos tres pocillos de tres placas independientes. Los valores medios que son significativamente diferentes se indican mediante barras y asteriscos de la siguiente manera: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$ 168

Figura 41. Score de virulencia de *C. elegans* (CEVS) en función de la clonalidad. Las cepas no virulentas (CEVS 1 a 2) se muestran en tonos morado y azul y las cepas virulentas (CEVS 3 a 5) se muestran en tonos amarillo, naranja y rojo. Los valores que son significativamente diferentes se indican mediante asteriscos: *, menor virulencia ($P < 0.05$). 168

Figura 42. Letalidad de los clones de alto riesgo en el modelo de *C. elegans*. Se indican los resultados de los clones de alto riesgo ST235 (a) y ST175 (b). Se muestra el número medio de nematodos supervivientes a las 0, 24, 72 y 168 horas. Los valores de la cepa PAO1 (línea roja continua) y PA14 (línea verde continua) se incluyeron con fines comparativos. La cepa OP50 de *E. coli* (línea azul continua), utilizada para alimentar a los nematodos, se usó como control no patógeno. 169

Figura 43. Citotoxicidad sobre cultivos de células A549 en función del genotipo del SST3. Se indican los resultados tras 3 horas de infección (MOI de 100). Los valores son medias \pm desviaciones estándar de al menos tres pocillos de tres placas independientes. Los valores medios que son significativamente diferentes se indican mediante barras y asteriscos de la siguiente manera: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$ 170

Figura 44. Score de virulencia de *C. elegans* (CEVS) en función del genotipo del SST3. Las cepas no virulentas (CEVS 1 a 2) se muestran en tonos morado y azul y las cepas virulentas (CEVS 3 a 5) se muestran en tonos amarillo, naranja y rojo. Los valores que son significativamente diferentes se indican mediante asteriscos: *, menor virulencia ($P < 0.05$); **, mayor virulencia ($P < 0.05$). 170

- Figura 45.** Letalidad de los genotipos del SST3 en el modelo de *C. elegans*. Se indican los resultados de los clones del genotipo *exoU*⁺ (a) y *exoU*⁻ (b). Se muestra el número medio de nematodos supervivientes a las 0, 24, 72 y 168 horas. Los valores de la cepa PAO1 (línea roja continua) y PA14 (línea verde continua) se incluyeron con fines comparativos. La cepa OP50 de *E. coli* (línea azul continua), utilizada para alimentar a los nematodos, se usó como control no patógeno. 171
- Figura 46.** Citotoxicidad sobre cultivos de células A549 en función del serotipo O. Se indican los resultados tras 3 horas de infección (MOI de 100). Los valores son medias \pm desviaciones estándar de al menos tres pocillos de tres placas independientes. Los valores medios que son significativamente diferentes se indican mediante barras y asteriscos de la siguiente manera: ** $P < 0.001$ 172
- Figura 47.** Score de virulencia de *C. elegans* (CEVS) en función del serotipo del antígeno O. Las cepas no virulentas (CEVS 1 a 2) se muestran en tonos morado y azul y las cepas virulentas (CEVS 3 a 5) se muestran en tonos amarillo, naranja y rojo. Los valores que son significativamente diferentes se indican mediante asteriscos: *, menor virulencia ($P < 0.05$); **, mayor virulencia ($P < 0.05$). 172

PRESENTACIÓN

La utilización indiscriminada de antibióticos ha dado lugar a la selección y diseminación de cepas y/o clones bacterianos multirresistentes convirtiéndose en una prioridad asistencial y de salud pública reconocida por las principales instituciones nacionales e internacionales de salud. Este hecho ha supuesto un gran reto para los clínicos y los profesionales encargados de la vigilancia y control de la infección. Por este motivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido como máxima prioridad la lucha contra la resistencia antibiótica, de tal forma que, en febrero de 2017, publicó una lista de patógenos prioritarios que deben ser vigilados, entre los que se encuentran algunas de las bacterias más importantes en los entornos hospitalarios incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria suele presentar una alta capacidad de diseminación epidémica, no sólo intrahospitalaria sino también inter- y extrahospitalaria.

Una cepa bacteriana de “éxito” o clon de alto riesgo puede transmitir horizontalmente y con notable frecuencia un gran número de elementos de resistencia. Asimismo, estos clones de alto riesgo tienen una gran capacidad para acumular mutaciones y genes de resistencia en sus estructuras genéticas, presentando, además, una gran habilidad de persistencia. Son, por tanto, un vehículo eficaz para la difusión no solo de mecanismos de resistencia, sino de otros elementos genéticos como son los factores de virulencia. La existencia de clones epidémicos multirresistentes adaptados al entorno hospitalario tiene importantes implicaciones prácticas para el manejo, control y prevención de las infecciones nosocomiales.

En el ambiente hospitalario, debido a la elevada presión antibiótica, los mecanismos de transmisión horizontal pueden actuar como nexo entre virulencia y resistencia. Los estudios sobre los efectos de la resistencia en el *fitness* o en la eficacia biológica, con frecuencia documentan un coste variable del mismo. En muchos casos, se han revelado atenuaciones de la virulencia, lo que lleva a la opinión de que los patógenos multirresistentes incurren en compensaciones fijas que comprometen su potencial patogénico y en consecuencia la gravedad de las infecciones. Sin embargo, este efecto podría variar en función del contexto genético de los clones de alto riesgo multirresistentes involucrados.

En este marco se desarrolla el presente trabajo en el que se intentará dar respuesta a una observación surgida en la práctica clínica habitual mediante una investigación traslacional que incluye una doble aproximación: una clínica y una experimental. Así, el conocimiento de las características clínicas y patogénicas de *P. aeruginosa* en función de su fenotipo de resistencia, podrá ser de utilidad en el desarrollo de estrategias de diagnóstico precoz, en el control de la infección y en la optimización del tratamiento antibiótico, incluyendo las nuevas opciones terapéuticas ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam.

RESUMEN

Resumen

A pesar del aumento creciente de cepas multirresistentes (MDR) de *Pseudomonas aeruginosa*, a través de la diseminación de una serie de clones epidémicos de alto riesgo (ST111, ST175 y ST235), el impacto clínico de la resistencia antibiótica en el pronóstico de la bacteriemia por *P. aeruginosa* sigue siendo un tema controvertido. El análisis de la asociación y el efecto de los determinantes propios del patógeno podrían contribuir a individualizar el abordaje de estos pacientes. Para ello, se realizó un análisis retrospectivo de una cohorte observacional integrada por 243 pacientes con bacteriemia por *P. aeruginosa* en nuestro centro, entre enero de 2013 y diciembre de 2017. Se analizaron las características epidemiológicas y clínicas de la cohorte, las características microbiológicas de las cepas (fenotipo de resistencia, estructura poblacional, genotipo de virulencia y serotipo del antígeno O), y los factores pronósticos de mortalidad global precoz (a 5 días) y tardía (a 30 días) mediante análisis univariante y multivariante por regresión logística. Por otro lado, se estudiaron las características patogénicas de 38 (21 MDR y 17 no MDR) cepas de *P. aeruginosa* representativas mediante un ensayo *in vitro* de citotoxicidad celular y un ensayo *in vivo* de letalidad en el modelo invertebrado *Caenorhabditis elegans*. Los resultados obtenidos indicaron que el 38.3% (93/243) de los episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa* estuvieron causados por cepas MDR. La mortalidad global precoz (20.2% [49/243]) y tardía (33.3% [81/243]) fue más frecuente en pacientes con bacteriemia por cepas MDR (34.4% versus 11.3%, $P<0.001$; y 52.7% versus 21.3%, $P<0.001$, respectivamente). La mortalidad precoz se asoció independientemente con la presencia de neutropenia (odds ratio [OR]: 9.21, intervalo de confianza al 95% [IC 95%]: 3.40-24.9, $P<0.001$), el índice de Pitt (OR: 2.42, IC 95%: 1.34-4.36, $P=0.003$), el foco respiratorio (OR: 3.23, IC 95%: 2.01-5.16, $P<0.001$), el tratamiento empírico inadecuado (OR: 4.57, IC 95%: 1.59-13.1, $P=0.005$), el tiempo de positividad del hemocultivo (OR: 0.88, IC 95%: 0.80-0.97; $P=0.010$), el genotipo de virulencia *exoU*⁺ (OR: 3.58, IC 95%: 1.31-9.79, $P=0.013$), y el serotipo O11 (OR: 3.64, IC 95%: 1.20-11.1, $P=0.022$). Estos factores pronósticos también se identificaron para la mortalidad tardía, así como el fenotipo MDR (OR: 2.18, IC 95%: 1.04-4.58, $P=0.040$). Además, la mayoría de las cepas MDR asociadas al clon de alto riesgo ST235 presentaron el genotipo de virulencia *exoU*⁺ (100% [12/12]) y el serotipo O11 (83.3% [10/12]), presentando una mayor citotoxicidad *in vitro* y produciendo una mayor letalidad en el modelo de *C. elegans*, en comparación con las cepas MDR pertenecientes al clon de alto riesgo ST175, caracterizadas por una baja virulencia. Al margen de los factores relevantes del huésped y de la terapia antibiótica empírica inadecuada, algunos determinantes propios del patógeno como el fenotipo MDR, el genotipo *exoU*⁺ y el serotipo O11 se deberían tener en cuenta en el pronóstico de la bacteriemia por *P. aeruginosa*.

Abstract

Despite the increasing prevalence of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* strains through the successful worldwide spread of the so-called epidemic high-risk clones (ST111, ST175 and ST235), the clinical impact of antibiotic resistance in the prognosis of *P. aeruginosa* bacteremia remain unclear. The analysis of the association and the effect of specific pathogen related factors could contribute to individualizing the approach of these patients. For this purpose, we performed a retrospective analysis of an observational cohort including 243 patients with *P. aeruginosa* bacteremia at our center from January 2013 to December 2017. We assessed clinical and epidemiological characteristics of the cohort, microbiological data of *P. aeruginosa* strains (resistance phenotype, population structure, virulence genotype and O-antigen serotype), and prognostic factors for early (5-day) and late (30-day) overall mortality by univariate and multivariate logistic regression analysis. On the other hand, we examined the pathogenic characteristics of 38 (21 MDR and 17 non-MDR) well-characterized *P. aeruginosa* strains using *in vitro* cytotoxicity assay and *in vivo* *Caenorhabditis elegans* infection model. The results obtained indicate that 38.3% (93/243) of the *P. aeruginosa* bacteremia episodes were caused by MDR strains. Early (20.2% [49/243]) and late (33.3% [81/243]) overall mortality was most frequent among patients with MDR *P. aeruginosa* (34.4% versus 11.3%, $P<0.001$ and 52.7% versus 21.3%, $P<0.001$, respectively). Early mortality was associated independently with neutropenia (odds ratio [OR]: 9.21, 95% confidence interval [95% CI]: 3.40-24.9, $P<0.001$), Pitt score (OR: 2.42, IC 95%: 1.34-4.36, $P=0.003$), respiratory source (OR: 3.23, IC 95%: 2.01-5.16, $P<0.001$), inadequate empirical therapy (OR: 4.57, IC 95%: 1.59-13.1, $P=0.005$), time to positivity of blood culture (OR: 0.88, IC 95%: 0.80-0.97; $P=0.010$), *exoU*-positive genotype (OR: 3.58, IC 95%: 1.31-9.79, $P=0.013$), and O11 serotype (OR: 3.64, IC 95%: 1.20-11.1, $P=0.022$). These risk factors were also identified for late mortality, as well as MDR phenotype (OR: 2.18, IC 95%: 1.04-4.58, $P=0.040$). Moreover, most of the MDR strains associated with the ST235 high-risk clone showed the *exoU*-positive genotype (100% [12/12]) and the O11 serotype (83.3% [10/12]), exhibited a greater *in vitro* cytotoxicity and higher lethality in the *C. elegans* model, compared to MDR strains belonging to the ST175 high-risk clone, characterized with a particularly low virulence. In conclusion, besides relevant clinical variables and inadequate empirical antibiotic therapy, some pathogen-related factors such as MDR phenotype, *exoU*-positive genotype and O11 serotype adversely affect the outcome of *P. aeruginosa* bacteremia.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

1. Publicaciones en revistas científicas indexadas

- **Recio R**, Villa J, Viedma E, Orellana MÁ, Lora-Tamayo J, Chaves F. Bacteraemia due to extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 high-risk clone: facing the perfect storm. *Int J Antimicrob Agents* 2018; 52:172-9.
- **Recio R**, Mancheño M, Viedma E, Villa J, Orellana MÁ, Lora-Tamayo J, Chaves F. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and impact of antimicrobial resistance and bacterial virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 2020; 64: e01759-19.
- **Recio R**, Sánchez-Diener I, Viedma E, Meléndez-Carmona MÁ, Villa J, Orellana MÁ, Mancheño M, Juan C, Zamorano L, Lora-Tamayo J, Chaves F, Oliver A. Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia isolates in a high-endemicity setting for ST175 and ST235 high-risk clones. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020; 39:671-78.

2. Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales

- **Recio R**, Villa J, Viedma E, Orellana MÁ, Chaves F. Predominio de los clones de alto riesgo ST175 VIM-2 y ST235 GES-5 en bacteriemias por *Pseudomonas aeruginosa* extremadamente resistente en un hospital terciario. XXI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Málaga, mayo 2017.
- **Recio R**, Villa J, Viedma E, Lora-Tamayo J, Orellana MÁ, Chaves F. Outcome of extensively Drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in a high-endemicity setting for ST235 high-risk clone. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Madrid, abril 2018.
- **Recio R**, Villa J, Viedma E, Orellana MÁ, Lora-Tamayo J, Chaves F. El genotipo de virulencia exoU como predictor de mortalidad en bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa*. XXII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Bilbao, mayo 2018.
- **Recio R**, Mancheño M, Viedma E, Villa J, Orellana MÁ, Lora-Tamayo J, Chaves F. Interacción entre la multirresistencia y la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* y su impacto en la mortalidad precoz de los pacientes con bacteriemia. XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Madrid, mayo 2019.

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C:	grados centígrados
μL:	microlitro
μM:	micromolar
ADN:	ácido desoxirribonucleico
AMI:	amikacina
ATM:	aztreonam
ATP:	adenosín trifosfato
BLEE:	β-lactamasa de espectro extendido
CAZ:	ceftazidima
CAZ/AVI:	ceftazidima-avibactam
CMI:	concentración mínima inhibitoria
CIP:	ciprofloxacino
COL:	colistina
EDTA:	ácido etilendiaminotetracético
EMA:	enzima modificante de aminoglucósidos
FEP:	cefepime
GEN:	gentamicina
h:	horas
IC:	intervalo de confianza
IMP:	imipenem
PCR:	<i>polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
MBL:	metalo-β-lactamasas
MDR:	<i>multidrug-resistant</i> (multirresistente)
MER:	meropenem
min:	minutos

mL:	mililitros
mM:	micromolar
MOI:	<i>multiplicity of infection</i> (multiplicidad de infección)
MLST:	<i>multilocus sequence typing</i> (tipificación multilocus de secuencias)
OR:	<i>odds ratio</i> (razón de ventajas)
Pb:	pares de bases
PDR:	<i>Pandrug-resistant</i> (panrresistente)
PFGE:	<i>pulsed-field gel electrophoresis</i> (electroforesis en gel de campo pulsado)
PIP/TZ:	piperacilina-tazobactam
QS:	<i>quorum sensing</i> (sistema sensor de densidad de población)
RIQ:	rango intercuartílico
ROC:	<i>receiver operating characteristic</i> (característica operativa del receptor)
SCV:	<i>Small colony variant</i> (variante de colonia pequeña)
seg:	segundos
SST3:	sistema de secreción tipo III
ST:	<i>sequence type</i> (secuencia tipo)
T ^a :	temperatura
TCMH:	trasplante de células madre hematopoyéticas
TOB:	tobramicina
TOL/TZ:	ceftolozano-tazobactam
TOS:	trasplante de órgano sólido
TP:	tiempo hasta positividad
UCI:	unidad de cuidados intensivos
UFC:	unidades formadoras de colonia
VM:	ventilación mecánica
XDR:	<i>extensively drug-resistant</i> (extremadamente resistente)

INTRODUCCIÓN

1. Características generales de *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es la principal especie patógena del ser humano dentro del género *Pseudomonas*, perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*, al orden Pseudomonadales, a la clase Gammaproteobacteria, al filo Proteobacteria, y al dominio Bacteria.

P. aeruginosa es un bacilo Gram-negativo, recto o ligeramente curvado, con una longitud de 1.5-3 μm y una anchura de 0.5-1 μm , no formador de esporas, provisto de uno o varios flagelos polares que le confieren motilidad, y de pili que le permiten adherirse a las superficies (1). Es muy versátil metabólicamente, pudiendo utilizar más de 80 compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía. Posee un metabolismo respiratorio estrictamente aerobio con oxígeno como el receptor final de electrones, aunque en condiciones de anaerobiosis puede utilizar los nitratos (2). Es oxidasa y catalasa positivo, y no fermentador de lactosa. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, aunque es capaz de crecer en un rango de temperatura entre 4-42°C.

Las colonias de *P. aeruginosa* suelen ser extensas, aplanadas, con bordes irregulares, a veces con brillo metálico (**Figura 1a**), y presentan un olor característico a uva o fruta madura debido a la producción de diferentes compuestos volátiles. También pueden aislarse otras morfologías como las variantes mucosas y/o de colonia pequeña (*small colony variants*, SCV), habitualmente relacionadas con infecciones crónicas (apartado 2.2.3). Una característica no esencial de *P. aeruginosa* es la producción de diferentes pigmentos hidrosolubles como pioverdina (amarillo-verde), piocianina (azul), piorrubina (rojo) y/o piomelanina (marrón-negro) (**Figura 1b**). El término “*aeruginosa*” (*aeruginosus*), que significa color de cobre oxidado, hace referencia a estos pigmentos (1,2).

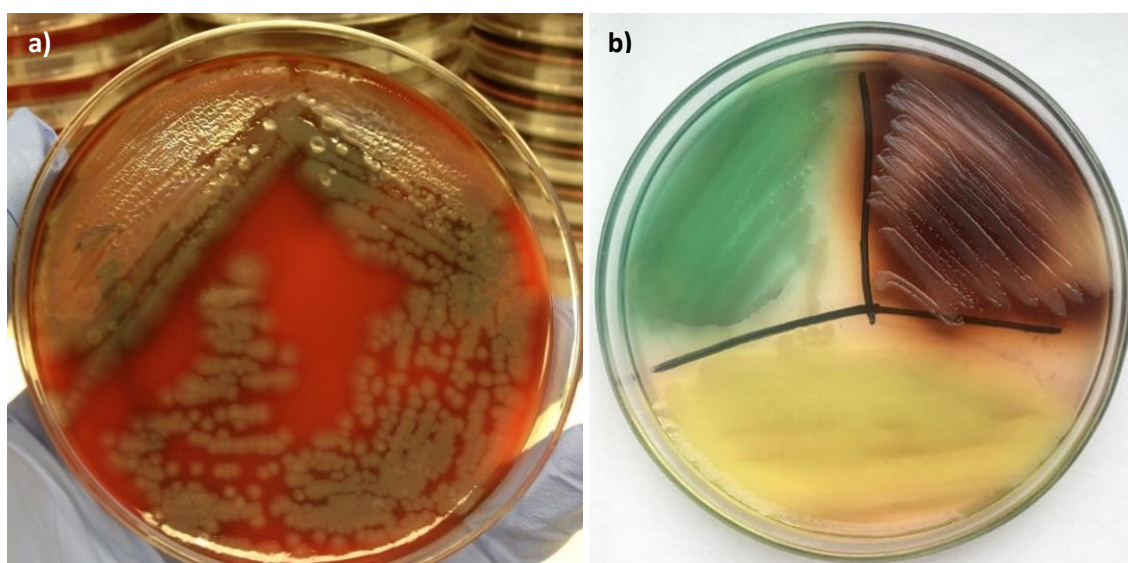


Figura 1. Colonias de *P. aeruginosa*. Crecimiento de *P. aeruginosa* en agar sangre (a). Producción de diferentes pigmentos de *P. aeruginosa* en agar Müller-Hinton (b).

P. aeruginosa es un microorganismo ubicuo, pudiendo hallarse en una gran variedad de hábitats, con especial predilección por los ambientes húmedos. Es capaz de colonizar multitud de nichos ecológicos ambientales, así como los seres vivos, incluyendo plantas, animales y el ser humano (1). En el entorno hospitalario puede aislarse en multitud de soluciones acuosas, como desinfectantes y soluciones de limpieza, así como en sistemas de ventilación, duchas y equipos de respiración asistida. También es usual encontrarla en reservorios comunitarios, como duchas, piscinas, cabinas de hidromasaje y baños, soluciones de lentes de contacto, cosméticos, superficie de alimentos, etc. (3). Menos frecuente es hallarla formando parte de la microbiota humana, principalmente del tubo digestivo, tracto respiratorio y superficies cutáneas (4). Sin embargo, la tasa de colonización en estas localizaciones anatómicas es especialmente notable en pacientes hospitalizados y/o inmunodeprimidos con ingresos prolongados y/o tratados con antibioterapia de amplio espectro (3–5).

P. aeruginosa posee un genoma grande y complejo (5-7 millones de pares de bases), que incluye una gran proporción de genes reguladores (>8%). Estas características junto con su versatilidad metabólica, el transporte y expulsión de sustancias, y la plasticidad genómica documentada, explican la gran capacidad de este patógeno para adaptarse, sobrevivir y persistir en entornos desfavorables, así como para tolerar condiciones ambientales adversas. Además, su genoma codifica un repertorio notable de determinantes de virulencia, y una excelente maquinaria intrínseca de resistencia a los antibióticos, confiriéndole una capacidad extraordinaria para causar infecciones y evadir la actividad de los tratamientos antimicrobianos (6–8).

2. Determinantes de patogenicidad y virulencia de *P. aeruginosa*

Una característica particular de *P. aeruginosa* es la localización de los genes responsables de su virulencia, ya que habitualmente no están alojados en las llamadas islas de patogenicidad como en la mayoría de los microorganismos, sino que se encuentran distribuidos por el genoma (6). Sin embargo, algunas cepas difieren considerablemente en su virulencia debido a la contribución de las citadas regiones genómicas, que son segmentos de ADN movilizados en plásmidos que se transfieren horizontalmente (transducción, conjugación o transformación) y con frecuencia se integran entre los genes del ARNt, caracterizándose por poseer un contenido en guanina + citosina marcadamente diferente del resto del genoma (9). En *P. aeruginosa* se denominan PAPI (*Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity islands) o PAGI (*Pseudomonas aeruginosa* genomic islands), las cuales incrementan la virulencia de las cepas portadoras, como PAPI-1 y PAPI-2, descritas en la cepa hipervirulenta PA14. PAPI-1 tiene un tamaño de 108 kb y codifica para la síntesis de pili tipo IV y factores implicados tanto en la producción de *biofilms* como en la resistencia antibiótica. En contraste, PAPI-2 es más pequeña, con 11 kb, y codifica para la potente exotoxina ExoU (apartado 2.1.2) (10).

P. aeruginosa se caracteriza por poseer un amplio arsenal de factores de virulencia que le permiten infectar las células del huésped y establecer el proceso infeccioso (**Figura 2**) (11–14).

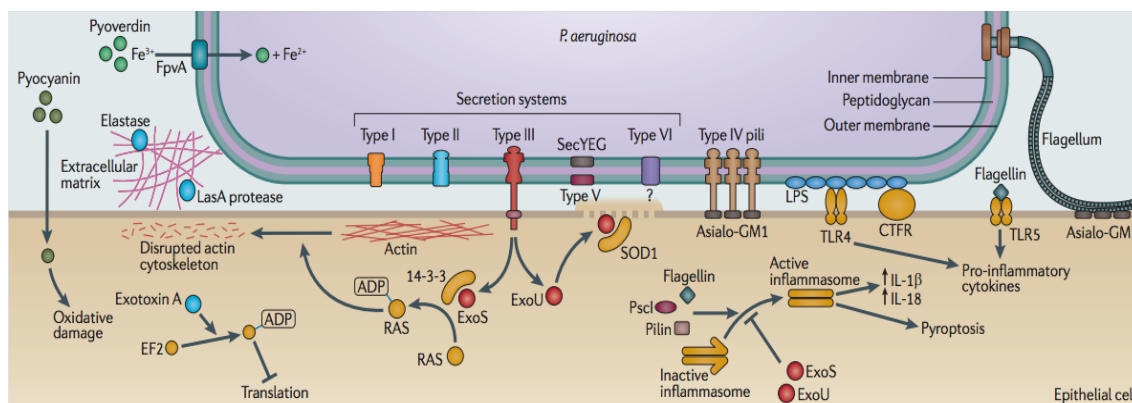


Figura 2. Determinantes de patogenicidad y virulencia de *P. aeruginosa*. Tomado de Mandell *et al.* (1).

Sin embargo, estos factores de virulencia no son expresados por igual en todos los momentos de la infección, existiendo diferencias entre los aislamientos de infecciones agudas y los de infecciones crónicas. En las primeras, producidas por bacterias planctónicas o bacterias en vida libre, predominan los factores de virulencia propiamente dichos; mientras que en las infecciones crónicas desempeña un papel importante el estilo de vida sésil, donde estos factores de virulencia están atenuados, pero presentan una mayor capacidad para producir *biofilms*, gracias a un sistema de densidad de población llamado *quorum sensing* (QS).

2.1. Determinantes de virulencia en infecciones agudas

Se postula que la infección aguda por *P. aeruginosa* comprende tres etapas: 1) adhesión y colonización, 2) invasión y destrucción local y 3) diseminación y respuesta sistémica. Cada etapa es requisito necesario para la siguiente, pero la cadena infectiva puede detenerse en cualquiera de las tres fases. En cada una de estas etapas predominan una serie de determinantes de virulencia que permiten a *P. aeruginosa* establecer el proceso infeccioso (**Tabla 1**).

Tabla 1. Principales determinantes de virulencia en infecciones agudas por *P. aeruginosa*.

Etapas de la infección aguda	Determinante de virulencia	Efecto en el huésped
Adhesión y colonización	Adhesinas Flagelo Alginato	Adherencia a las células y motilidad Motilidad y adherencia a las células Barrera antifagocítica, <i>biofilms</i> , etc.
Invasión y destrucción local	Exotoxinas (SST3) ExoU ExoS y ExoT ExoY Exotoxina A (SST2) EstA (SST5a) LepA (SST5b) Hcp1 (SST6) Piocianina Proteasas Hemolisinas Exolisina A Sideróforos Pioverdina Pioquelina	Alteraciones intracelulares Actividad fosfolipasa y necrosis celular Reorganización del citoesqueleto Aumento de AMPc Bloqueo de síntesis proteica Producción de ramnolípido y motilidad Inducción de la activación NF-κB Formador de nanotubos celulares Actividad citotóxica Actividad elastolítica Hidrólisis de la matriz extracelular Invasión epitelial y vascular Captación del hierro (Fe ³⁺) Inductor de exotoxina A y <i>biofilms</i> Daño oxidativo e inflamación tisular
Diseminación y respuesta sistémica	Lipopolisacárido Exoenzima S	Toxicidad sistémica Invasión vascular y toxicidad sistémica

SST: tipo de sistema de secreción.

2.1.1. Adhesión y colonización tisular

Entre los principales factores de virulencia que favorecen la adhesión y colonización de *P. aeruginosa* a los tejidos cabe destacar:

- **Adhesinas:** son moléculas de la superficie bacteriana que permiten al microorganismo unirse a las superficies celulares a través de receptores específicos. Las más importantes son los pili tipo IV, localizados en los polos de la bacteria y que permiten la unión de *P.*

aeruginosa a los gangliósidos asialo-GM1 de las células epiteliales. Además, intervienen en la motilidad tipo *swarming* (en medios semisólidos) y *twitching* (tipo espasmos), y en la agregación bacteriana favoreciendo la formación de *biofilms* (15).

- **Flagelo:** confiere a *P. aeruginosa* una serie de propiedades que incluyen: 1) motilidad tipo *swimming* (en medios líquidos) y *swarming*, 2) la habilidad de unirse a los tejidos, y 3) debido a su inmunogenicidad, actúa favoreciendo el inicio de la cascada inflamatoria (16).
- **Alginate:** es un copolímero lineal hiperproducido por algunas cepas de *P. aeruginosa* ante la escasez de nitrógeno y el aumento de osmolaridad del medio, y que forma un gel viscoso alrededor de la bacteria, dando un aspecto mucoso a las colonias. Tiene diversos efectos: 1) antioxidante de los radicales libres liberados por los macrófagos, 2) barrera física que impide la fagocitosis, 3) inhibidor de la quimiotaxis de los neutrófilos y la activación del complemento, y 4) potenciador de la formación de *biofilms* (17).

2.1.2. Invasión y destrucción tisular local

Una vez adherida a la célula hospedadora, *P. aeruginosa* secreta diversos factores de virulencia que conducen a la invasión y destrucción tisular. Entre estos determinantes cabe destacar:

- **Toxinas:** en *P. aeruginosa* se han identificado diversas toxinas que son secretadas a través de diferentes sistemas de secreción. Las más importantes son:
 - Exotoxinas (ExoS, ExoT, ExoU, ExoY): constituyen el principal determinante de virulencia de *P. aeruginosa* en infecciones agudas, en las que su expresión se ha asociado a un peor pronóstico y mortalidad tanto en estudios clínicos como experimentales (11,18–24). Son inoculadas directamente en el citoplasma de la célula hospedadora, quedando así protegidas de la acción de los anticuerpos, mediante el sistema de secreción tipo III (SST3). Así, cuando la bacteria se une a la superficie de la célula del huésped, el SST3 forma un canal por el que penetran estas exotoxinas al interior de la célula. Su expresión es variable en diferentes cepas de *P. aeruginosa*: la mayoría presentan tanto el genotipo *exoT* como *exoY*, mientras que los genotipos *exoU* y *exoS* son prácticamente excluyentes (las cepas que albergan PAPI-2 y *exoU*⁺ presentan una delección del gen *exoS*) (25,26). En general, estas toxinas causan alteraciones intracelulares, contribuyendo a la lesión tisular y reduciendo la efectividad de la defensa fagocítica del huésped. En concreto, ExoU presenta una importante actividad citotóxica para las células epiteliales y macrófagos, donde ejerce una potente actividad fosfolipasa, provocando la pérdida de integridad de la membrana celular causando su rápida necrosis. Además, modula la expresión génica de las células epiteliales, y aumenta la concentración de Ca²⁺ intracelular, activando varias rutas de señalización

intracelular, entre las que destaca la liberación de citoquinas proinflamatorias. ExoY es una adenilato ciclasa que aumenta los niveles de AMPc en las células hospedadoras, dando lugar a una reorganización anómala del citoesqueleto de actina. ExoS y ExoT se comportan de manera similar en las células epiteliales y macrófagos produciendo varios efectos: 1) activación e inactivación de ciertas proteínas involucradas en los procesos de transducción de señales, 2) liberación de citoquinas proinflamatorias, y 3) reorganización del citoesqueleto a través de inactivación de GTPasas Rho (11,18).

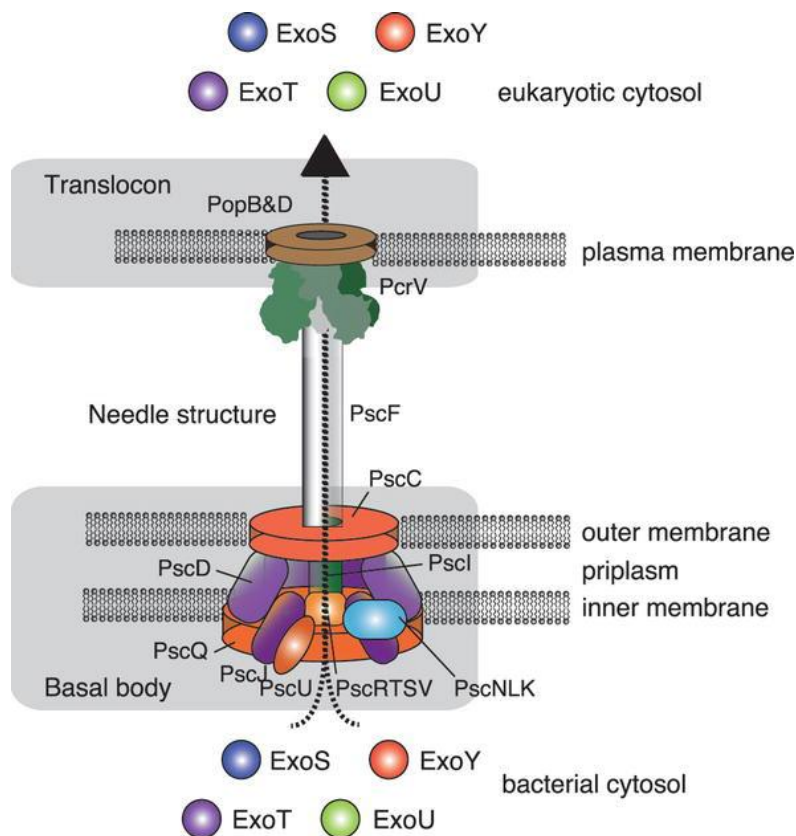


Figura 3. Estructura del sistema de secreción tipo III de *P. aeruginosa*. Adaptado de Naito *et al.* (25).

La maquinaria de secreción está formada por unas 20 proteínas distintas denominadas Psc, Pop y Pcr (**Figura 3**). La proteína PscF es el componente principal del inyectisoma, que se ensambla a otras dos proteínas PscE y PscG para formar la estructura central. Las proteínas PopB, PopD y PcrV son esenciales para la formación del poro (2.8-6.0 nm de diámetro) en la membrana de las células, denominado translocón. Recientemente se ha descrito otro papel importante de las proteínas PopB y PopD, además de su función estructural. Este translocón puede actuar como factor de virulencia, induciendo la cascada inflamatoria, ya que una vez se ancla a la membrana plasmática y forma el poro, permite el paso de K⁺, provocando la activación de la señalización intracelular y la liberación de citoquinas proinflamatorias (27).

- Otras toxinas: además de las exotoxinas del SST3, *P. aeruginosa* posee otras toxinas que son liberadas directamente al medio extracelular. Entre ellas destacan: 1) **exotoxina A**, secretada mediante el sistema de secreción tipo II (SST2). Lleva a cabo la inhibición del factor de elongación 2 (EF-2), imprescindible para la síntesis proteica, mediante ADP-ribosilación, contribuyendo al daño tisular y la disminución de la actividad de los fagocitos. Su producción está regulada por los niveles de hierro del medio (28); 2) **EstA**, una esterasa implicada en la producción de ramnolípido, la motilidad, y la producción de *biofilms*. Es secretada mediante el sistema de secreción tipo Va (SST5a), un sistema consistente en un autotransporte de la propia proteína que forma un canal similar a una porina de la membrana externa, a la cual queda anclada por su cara extracelular (29); 3) **LepA**, una exoproteasa inductora de la activación del factor nuclear κB (NF- κB). Se secreta al medio por el sistema de secreción tipo Vb (SST5b), un sistema más sofisticado que el SST5a, cuyo canal de la membrana externa lo forma una segunda proteína (30); 4) **Hcp1**, una proteína hexamérica que genera un nanotubo que forma parte del sistema de secreción tipo VI (SST6), un sistema formado por un complejo multimérico que atraviesa la pared celular y que inyecta proteínas efectoras directamente dentro de la célula diana, de manera similar al SST3 (31); y 5) **piocianina**, un pigmento azulado producido por algunas cepas de *P. aeruginosa* que resulta tóxico para las células del huésped. Su producción está regulada por los sistemas de QS. Interviene en la modulación del ciclo redox, generando especies reactivas de oxígeno; en la inhibición de la respiración celular, reduciendo los niveles de AMPc y ATP; y en la alteración de la respuesta inmune modulando los niveles de citoquinas proinflamatorias (32).
- **Proteasas**: *P. aeruginosa* secreta varias enzimas capaces de inactivar factores inmunitarios del huésped y de degradar diferentes componentes de la matriz extracelular permitiendo su avance en el proceso infeccioso. Las más importantes son **LasA** (serín-proteasa) y **LasB** (zinc-metaloproteasa), que se secretan al medio extracelular mediante el SST2. Ambas actúan coordinadamente para llevar a cabo una actividad elastolítica activando a la proteasa alcalina y la elastasa de los neutrófilos. La producción de ambas enzimas está influida por la concentración extracelular de zinc y hierro, y regulada por los sistemas QS (17).
- **Hemolisinas**: *P. aeruginosa* produce otros factores extracelulares como son: 1) **fosfolipasa C**, una hemolisina termolábil que degrada los lípidos y la lecitina, favoreciendo la destrucción tisular (33); 2) **ramnolípido**, una hemolisina termoestable que solubiliza los fosfolípidos y la lecitina, e inhibe la actividad ciliar del aparato respiratorio (34); y 3) **exolisina A**, una citolisina identificada recientemente en un subconjunto de cepas de *P. aeruginosa* que carecen del SST3 (35). Es secretada por un sistema de secreción que forma un poro en la membrana plasmática de las células epiteliales y endoteliales, induciendo la entrada masiva

de Ca^{2+} intracelular y activando varias rutas de señalización intracelular, entre las que destaca la activación de la proteína ADAMS-10. Esta proteína escinde la cadherina-E de las uniones intercelulares produciendo la pérdida de integridad del epitelio y/o endotelio (36).

- **Sideróforos:** son moléculas que actúan como quelantes específicos de alta afinidad del Fe^{3+} extracelular. La disponibilidad de hierro libre en el huésped puede ser un factor limitante para la viabilidad bacteriana en ausencia de sideróforos. Los complejos hierro-sideróforo son reconocidos por receptores de la membrana externa de la bacteria e internalizados mediante diferentes mecanismos dependientes de energía. *P. aeruginosa* es capaz de producir dos tipos de sideróforos con distinta afinidad por el hierro: 1) **pioverdina**, se trata de un pigmento amarillo-verdoso fluorescente producido por algunas cepas de *P. aeruginosa* que actúa como un sideróforo de alta afinidad, capaz de desplazar al hierro de la transferrina. También actúa como molécula señal que activa la producción de exotoxina, y participa en el establecimiento de *biofilms* maduros; y 2) **pioquelina**, cuya afinidad por el hierro es mucho más baja que la de la pioverdina, y puede causar daño oxidativo e inflamación, especialmente en presencia de piocianina (37).

2.1.3. Diseminación y respuesta sistémica

En la diseminación y respuesta inflamatoria sistémica intervienen los siguientes factores:

- **Lipopolisacárido:** es un complejo glucolipídico localizado en la membrana externa de la bacteria formado por tres regiones: 1) **lípid A o endotoxina**, que participa en el estímulo inmunológico favoreciendo la respuesta sistémica mediante la liberación de péptidos vasoactivos, citoquinas proinflamatorias, factores del complemento y de la coagulación facilitando la respuesta inflamatoria sistémica. Se considera el principal responsable del desarrollo de shock séptico en las infecciones invasivas por *P. aeruginosa*; 2) **polisacárido central o core**; y 3) **antígeno O**, determinante antigénico cuya variabilidad permite que sea utilizado para la clasificación del microorganismo en serotipos. Además, la expresión de cadenas largas del antígeno O durante las infecciones agudas protege a *P. aeruginosa* frente a la acción del complemento (38). La frecuencia de los diferentes serotipos O varía en función de la localización geográfica, siendo los serotipos O1, O4, O6 y O11 los más frecuentes (39,40). La expresión de algunos serotipos, como el O1 y O11, se ha asociado a un peor pronóstico en neumonía tanto en estudios clínicos como experimentales (41,42).
- **Exoenzima S:** enzima extracelular que interviene en la adherencia bacteriana al epitelio, ejerce funciones citotóxicas, y tiene actividad inmunomoduladora, favoreciendo la invasión vascular y la diseminación sistémica de la infección (43).

2.2. Determinantes de virulencia en infecciones crónicas

2.2.1. Sistema sensor de densidad de población (*quorum sensing*)

Es un fenómeno que permite a las bacterias de una población adaptarse al medio y ejercer su virulencia de forma coordinada tanto en la infección aguda como crónica. En general, el proceso se inicia con una molécula denominada autoinductor producida y secretada por la bacteria que se une a su proteína diana, formándose un complejo autoinductor-proteína capaz de activar la expresión del gen que controla. Los mejor conocidos son: 1) **sistema *las***, en el que la proteína LasI dirige la síntesis del autoinductor 3OC₁₂-HSL (*N*-3-oxododecanoil L-homoserina lactona), que se une a su diana LasR activando la expresión de *lasA*, *lasB*, y pioverdina. Además, participa en la maduración de los *biofilms*; y 2) **sistema *rhl***, en el que la proteína RhII cataliza la síntesis del autoinductor C₄-HSL (*N*-butiril L-homoserina lactona), que se une a su diana RhIR, activando la síntesis de ramnolípido, *lasB* y piocianina (44,45).

2.2.2. Formación de *biofilms*

Son estructuras de comunidades bacterianas altamente organizadas, en las que las bacterias se encuentran adheridas entre sí y a superficies inertes o tejidos vivos, embebidas en una matriz extracelular compuesta por exopolisacáridos, ADN y proteínas. La arquitectura de la matriz del *biofilm* no es sólida, sino que presenta canales que permiten el flujo de agua, oxígeno y nutrientes. El desarrollo de los *biofilms* es dependiente de la densidad celular, la disponibilidad de nutrientes y las fuentes de energía presentes en el medio, y queda controlado mediante el sistema QS. Sirven de reservorio a la infección ya que dificultan su erradicación al proporcionar a la comunidad bacteriana protección frente al sistema inmune y a los antibióticos (15,46).

2.2.3. Mecanismos adaptativos en infecciones crónicas

Entre las características adaptativas más frecuentes en las infecciones crónicas cabe destacar: 1) **fenotipo mucoide**, se debe a la hiperproducción de alginato, principalmente por la mutación del gen *mucA*, impidiendo la difusión de los antibióticos a su lugar de acción (47); 2) **fenotipo hipermutador**, debido principalmente a mutaciones en los genes de reparación del ADN como *mutL* y *mutS*, favoreciendo la adaptación, persistencia y desarrollo de resistencias antibióticas (48); 3) **variantes de colonia pequeña (*small colony variants*, SCV)**, caracterizadas por presentar una morfología puntiforme y crecimiento agregativo, confiriéndole una mayor tasa de resistencia a los antibióticos y formación de *biofilms* (49); y 4) **variantes con cambios en el SST3**, caracterizadas por la pérdida de uno o varios de sus componentes, lo cual indica su utilidad en infecciones agudas pero no en infecciones crónicas (50).

3. Mecanismos de resistencia antibiótica en *P. aeruginosa*

En general, la resistencia a los antibióticos en *P. aeruginosa* se debe a la combinación de varios factores (**Figura 4**) (51): 1) **resistencia intrínseca**, mediante la expresión constitutiva de un gran repertorio de genes de resistencia; y 2) **resistencia adquirida**, a través de mutaciones en genes cromosómicos y de la adquisición de determinantes de resistencia por transferencia horizontal. Tanto la resistencia intrínseca como la adquirida proporcionan a *P. aeruginosa* un extraordinario nivel de resistencia a los antibióticos, lo que le convierte en uno de los microorganismos más difíciles de tratar (52).

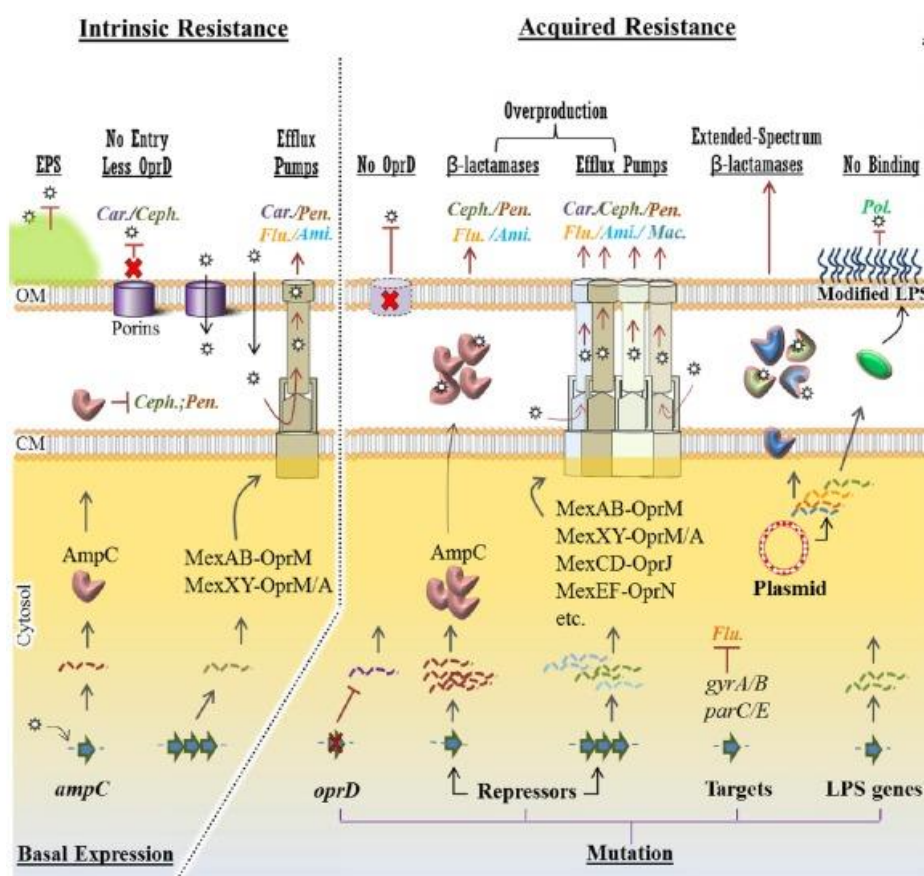


Figura 4. Mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa*. Adaptado de Moradali et al. (51).

3.1. Mecanismos de resistencia intrínseca (resistoma intrínseco)

La resistencia intrínseca o natural es aquella que presenta la bacteria en forma basal o salvaje. *P. aeruginosa* presenta una resistencia intrínseca superior a la mayoría de las bacterias Gram-negativas, lo que limita de entrada las opciones terapéuticas de estas infecciones (53). Esta resistencia intrínseca viene determinada por tres mecanismos: 1) baja permeabilidad de la membrana, 2) producción constitutiva o inducible de bombas de expulsión activa, y 3) expresión de β -lactamasa cromosómica inducible tipo AmpC.

3.1.1. Baja permeabilidad de la membrana

P. aeruginosa presenta una baja permeabilidad de la membrana externa debido a su estructura hidrófoba y al reducido número de porinas. Las porinas son canales de la membrana externa que desempeñan un papel importante en el transporte de antibióticos hidrofílicos como los β -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, y algunas fluoroquinolonas. La pérdida o disminución del número de estas porinas limita drásticamente el acceso de estos antibióticos al interior de la bacteria. Existen porinas inespecíficas entre las que destaca la porina **OprF**, utilizada como canal de entrada por β -lactámicos y fluoroquinolonas, y porinas selectivas, entre las que destaca la porina **OprD** que es el canal de entrada principal para los carbapenémicos (51,52).

3.1.2. Producción constitutiva o inducible de bombas de expulsión activa

Las bombas de eflujo o expulsión activa, presentes en la membrana plasmática, están implicadas en la excreción de β -lactámicos, fluoroquinolonas, macrólidos, sulfonamidas, tetraciclinas, cloranfenicol, novobiocina y trimetoprim. Para ello, usan la energía procedente de la hidrólisis de ATP o un mecanismo de transporte iónico. Dichos sistemas de expulsión se han agrupado en cinco superfamilias, siendo las más conocidas las de la **superfamilia RND** (*resistance-nodulation-cell division*), formadas por tres componentes: 1) proteína transportadora (membrana interna), proteína de fusión de membrana (periplásmica) y porina (membrana externa). Para la expulsión de antibióticos emplean la energía de la fuerza protón-motriz (transporte H^+ /antibiótico). La más frecuente es la bomba **MexAB-OprM**, con expresión constitutiva, que confiere resistencia a la mayoría de β -lactámicos (excepto imipenem), fluoroquinolonas, cloranfenicol y tetraciclinas, sin afectar a los aminoglucósidos. Por el contrario, la bomba **MexXY-OprM**, inducible por sustrato, contribuye a la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* a los aminoglucósidos (51,52,54).

3.1.3. Expresión de β -lactamasa cromosómica inducible AmpC

La expresión de la cefalosporinasa cromosómica inducible **AmpC**, no influida por los inhibidores de β -lactamasa clásicos (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam), le confiere resistencia a amoxicilina y a las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, con la excepción de ceftazidima. Estos antibióticos además son potentes inductores de esta enzima, como también lo son los carbapenémicos, aunque éstos no se ven afectados por su actividad. Por el contrario, ceftazidima, las cefalosporinas de cuarta generación (cefepime) y los monobactámicos (aztreonam) conservan su actividad al no inducir su producción (51,52). *P. aeruginosa* produce otras β -lactamasas cromosómicas no inducibles como la oxacilinasas OXA-50 y la imipenemasa PIB-1, aunque presentan poca relevancia en su resistencia intrínseca (55).

3.2. Mecanismos de resistencia adquirida (resistoma adquirido)

Los principales mecanismos que conducen al desarrollo de resistencia adicional en *P. aeruginosa* son: 1) mutaciones en genes cromosómicos, y 2) adquisición de determinantes de resistencia por transferencia horizontal a través de plásmidos o transposones (51,52). En la **Tabla 2** se resumen los principales mecanismos de resistencia adquiridos en *P. aeruginosa*.

Tabla 2. Principales mecanismos de resistencia adquirida en *P. aeruginosa*.

Mecanismos de resistencia		Antibióticos afectados
Mutaciones en genes cromosómicos		
Efectos	Genes mutados	Antibióticos afectados
Afinidad reducida por la diana Topoisomerasa II	<i>gyrA</i> y <i>gyrB</i>	Fluoroquinolonas
Topoisomerasa IV	<i>parC</i> y <i>parE</i>	Fluoroquinolonas
Desrepresión de AmpC	<i>ampD</i> , <i>ampR</i> y <i>dacB</i>	Penicilinas y cefalosporinas
Hiperexpresión de bombas MexAB-OprM	<i>mexR</i> (<i>nalB</i>), <i>nalC</i> y <i>nalD</i>	β-lactámicos y fluoroquinolonas
MexCD-OprJ	<i>nfxB</i>	β-lactámicos y fluoroquinolonas
MexEF-OprN	<i>mexT</i> y <i>nfxC</i>	Meropenem y fluoroquinolonas
MexXY-OprM	<i>mexZ</i>	β-lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos
Pérdida de OprD	<i>OprD</i> y <i>nfxC</i>	Imipenem y meropenem
Adquisición de determinantes de resistencia por transferencia horizontal		
β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) PER-1 GES OXA		Penicilinas, cefalosporinas de 3ª y 4ª generación y aztreonam
Carbapenemasas Clase A: KPC, GES y VEB Clase B (MBL): IMP, VIM, GIM-1, NDM-1, SIM-1 y SPM-1 Clase D: OXA-40 y -198		Penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos
Enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMA) AAC (6')-II AAC (3)-II ANT (2'')-I		Gentamicina, tobramicina y amikacina Gentamicina y tobramicina Gentamicina y tobramicina

BLEE: β-lactamasa de espectro extendido; MBL: metalo-β-lactamasa; EMA: enzima modificador de aminoglucósidos.

3.2.1. Mutaciones en genes cromosómicos

En *P. aeruginosa*, una mutación responsable de la adquisición de una determinada resistencia sucede aproximadamente en una de cada 10^6 - 10^8 células (56). La aparición secuencial de una segunda mutación en un clon ya mutado es más probable, lo cual se ve favorecido por el uso consecutivo de antibióticos para tratar las infecciones resistentes a un primer antibiótico, facilitándose la selección exitosa de mutaciones cromosómicas. Las más importantes son:

- **Mutaciones en genes codificantes para las topoisomerasas:** las mutaciones que afectan a los genes de las **topoisomerasas II** (*gyrA* y *gyrB*) y **IV** (*parC* y *parE*) son las que principalmente confieren resistencia a fluoroquinolonas. Forman parte de la región determinante de resistencia a quinolonas (*quinolone resistance-determining region*, QRDR). Su combinación con las mutaciones en las bombas de expulsión confiere resistencia de alto nivel (57,58).
- **Mutaciones en el sistema de regulación de AmpC:** las mutaciones en los genes que codifican para proteínas implicadas en la regulación de la expresión de AmpC (*ampG*, *dacB*, *ampD*, *ampR*, etc.) constituyen el mecanismo más importante de resistencia a β -lactámicos. Conducen a distintos grados de desrepresión irreversible de la producción de AmpC, reduciendo la sensibilidad a penicilinas (incluyendo las combinaciones con inhibidores de β -lactamasa), cefalosporinas (ceftazidima y cefepime) y monobactámicos (aztreonam) (59,60).
- **Mutaciones responsables de la hiperexpresión de bombas de expulsión activa:** las bombas de expulsión más importantes desde el punto de vista de la resistencia son: 1) **MexAB-OprM**, las mutaciones en los genes represores *mexR* (*nalB*), *nalC* y *nalD* aumentan la resistencia a β -lactámicos (excepto imipenem) y fluoroquinolonas; 2) **MexCD-OprJ**, la mutación inactivante en su regulador negativo *nfxB* da lugar al aumento de resistencia de la mayoría de β -lactámicos (incluido imipenem), fluoroquinolonas y aminoglucósidos; 3) **MexEF-OprN**, la mutación *nfxC* confiere resistencia a β -lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos; y 4) **MexXY-OprM**, la mutación del gen *mexZ*, favorece la resistencia a β -lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (61,62).
- **Mutaciones responsables de la disminución o ausencia de porinas:** las porinas más importantes desde el punto de vista de la resistencia son: 1) **OprF**, es la mayoritaria en *P. aeruginosa*. La mutación en el gen *oprF* produce su pérdida dando lugar a una sensibilidad reducida a β -lactámicos y fluoroquinolonas; y 2) **OprD**, la presencia de polimorfismos de OprD o la mutación del gen *oprD* produce su inactivación asociándose, en la mayoría de los casos, con resistencia a imipenem y sensibilidad reducida a meropenem. Su combinación con las mutaciones en las bombas de expulsión confiere resistencia de alto nivel (51,52,63).

3.2.2. Adquisición de determinantes de resistencia por transferencia horizontal

La adquisición horizontal de genes de resistencia suele darse por medio de elementos móviles, tales como plásmidos o transposones, que permiten la transferencia de material genético entre las bacterias, con el peligro epidemiológico que ello conlleva. En el caso de *P. aeruginosa*, existen dos tipos de enzimas cuyos genes se pueden transmitir horizontalmente: 1) las **β -lactamasas**, incluidas las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), y las carbapenemasas (**Tabla 3**); y 2) las **enzimas modificantes de aminoglucósidos** (EMA) (52,64). Ambos grupos de genes suelen estar localizados en el seno de **integrones de clase 1**, que son una familia de elementos genéticos potencialmente móviles capaces de integrar y expresar genes de resistencia antibiótica. A su vez, tales integrones se suelen situar en los denominados plásmidos o transposones.

Tabla 3. Clasificación e hidrólisis de las carbapenemasas en *P. aeruginosa*.

Clases (Ambler 1980)	Grupos (Bush <i>et al.</i> 2010)	Tipo de carbapenemasa	Inhibición por AC o TZ	Inhibición por EDTA	Características definitorias
A	2f	GES	+	-	Hidrólisis incrementada de carbapenémicos, oximino- β -lactámicos y cefamicinas
		KPC	+	-	
		IMI	+	-	
		SME	+	-	
B	3	IMP	-	+	Hidrólisis de amplio espectro incluyendo carbapenémicos, pero no aztreonam
		VIM	-	+	
		NDM	-	+	
		SPM	-	+	
		GIM	-	+	
C	2d	OXA	+/-	-	Hidrólisis de carbapenémicos

AC: ácido clavulánico; TZ: tazobactam; +: positiva; -: negativa; +/-: variable.

- **β -lactamasas:** son enzimas capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo β -lactámico, generando compuestos sin actividad. Representan un claro ejemplo de adaptación bacteriana, constituyendo una estrategia eficaz para evitar la acción bactericida de los β -lactámicos. El continuo descubrimiento de nuevas β -lactamasas ha generado problemas en su clasificación y nomenclatura, por lo que se han propuesto varias clasificaciones. Las más importantes son: 1) **clasificación de Ambler**, basada en la estructura molecular. Divide a las β -lactamasas en cuatro clases (A, B, C y D) basándose en la estructura de la enzima. Así, las clases A, C y D son serinenzimas, que contienen serina en su centro activo. Mientras que las de clase B son metaloenzimas, con Zn^{2+} en su centro activo, siendo las únicas inhibidas por

el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (65); y 2) **clasificación de Bush y Jacoby**, basada en características funcionales como el perfil del sustrato, la sensibilidad a inhibidores de β -lactamasas, la localización cromosómica y/o plasmídica de los genes codificantes, o su expresión. Se establecen tres grandes grupos (1, 2 y 3), con varios subgrupos. El grupo 1 que incluye enzimas de la clase C de Ambler que no son inhibidas por ácido clavulánico. El grupo 2 que incluye enzimas de las clases A y D de Ambler que se inhiben con ácido clavulánico. Y el grupo 3 que incluye enzimas de la clase B de Ambler que son inhibidas por EDTA (66). Las β -lactamasas más importantes desde el punto de vista de la resistencia son:

- β -lactamasas de espectro extendido (BLEE): son enzimas capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas (incluida ceftazidima y cefepime) y monobactámicos (aztreonam), pero no carbapenems. Estas enzimas pueden ser inactivadas por inhibidores de β -lactamasas como ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam. Entre ellas cabe destacar: 1) **tipo PER-1**, una β -lactamasa de clase A que confiere resistencia de alto nivel a ceftazidima y algo menor a penicilinas, cefotaxima y aztreonam. Se describió por primera vez en Francia en 1991 en un aislado de *P. aeruginosa* de un paciente turco (67). Posteriormente se ha descrito en países europeos y asiáticos, con particular frecuencia en Turquía (68); 2) **tipo GES (*Guiana extended-spectrum*)**, una β -lactamasa de clase A activa frente a penicilinas y cefalosporinas, pero no frente a cefamicinas y carbapenémicos (excepto GES-2, -4, -5, -6, -11 y -18). Actualmente hay reconocidas diferentes variantes en países de distintos continentes, la última descrita ha sido GES-18 en Bélgica, en 2010 (69). La primera BLEE de este grupo, GES-1, se descubrió en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* en la Guayana Francesa, en el 2000 (70); y 3) **tipo OXA**, una β -lactamasa de clase D activa frente a penicilinas, cefalosporinas (incluida ceftazidima y cefepime) y monobactámicos. Muestran una débil inhibición por el ácido clavulánico. Destacan sobre todo las variantes OXA-10 (OXA-11, -14, -16, -17, -19 y -28) y la variante OXA-2 (OXA-15 y OXA-539) (71). La primera BLEE de este grupo, OXA-11, se aisló en una cepa de *P. aeruginosa* en Turquía, en 1993 (72).
- Carbapenemasas: agrupan a todas las β -lactamasas que tienen un amplio espectro hidrolítico incluyendo a los carbapenémicos, lo cual reduce considerablemente las opciones terapéuticas para combatir estas infecciones. Éstas pertenecen a tres de las cuatro clases moleculares de Ambler (**Tabla 3**). Las más importantes desde el punto de vista de la resistencia son: 1) **tipo GES**, es una carbapenemasa de clase A con modesta actividad sobre los monobactámicos. Sólo seis poseen actividad carbapenemasa (GES-2, -4, -5, -6, -11, Y -18). Su hallazgo no es tan frecuente como el de otras carbapenemasas, aunque se ha aislado prácticamente en todo el mundo. En *P. aeruginosa* se han detectado de entre las que tienen

actividad carbapenemasa, únicamente las variantes GES-2, -5, -6 y -18 (55). Su diseminación puede originar situaciones epidémicas de cepas multirresistentes y extremadamente resistentes, como el brote epidémico ocurrido en el Hospital Universitario 12 de Octubre, donde una cepa productora de GES-1 y GES-5, se diseminó en el Servicio de Hematología durante el periodo 2007-2008, causando una elevada mortalidad (73); 2) **tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemases*)**, es una carbapenemasa de clase A con actividad frente a todos los β -lactámicos, aunque la eficiencia hidrolítica sobre los carbapenémicos y monobactámicos es hasta diez veces menor que sobre las penicilinas y cefalosporinas. Se describieron por primera vez en *K. pneumoniae* (74). En *P. aeruginosa* se han detectado solo dos variantes: KPC-2, en una cepa clínica en Colombia, y KPC-5, en Puerto Rico (75,76); 3) **tipos VIM (*Veronese imipenemase*) e IMP (*Active on imipenem*)**, son metalo- β -lactamasas (MBL) o de clase B, y probablemente el grupo más relevante de carbapenemasas a nivel mundial. Hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, y se inhiben con EDTA. La carbapenemasa IMP-1 se detectó por primera vez en 1991, en una cepa de *Serratia marcescens*, en Japón (77), mientras que VIM-1 se halló por primera vez en 1997, en un aislado de *P. aeruginosa* en Verona (78). Desde entonces se han descrito múltiples variantes de VIM e IMP. Las carbapenemasas tipo VIM son las detectadas de forma más habitual en Europa, donde VIM-2, se ha convertido en la MBL predominante en todo el mundo, relacionándose con brotes epidémicos. De hecho, su diseminación ha dado lugar a una situación endémica de cepas multirresistentes en el Hospital Universitario 12 de Octubre hasta este momento (79); y 4) **tipo OXA**, es una carbapenemasa de clase D, con actividad modesta sobre los carbapenémicos. La primera carbapenemasa de este tipo, OXA-23, fue descrita en 1993 en *Acinetobacter baumannii* (80). Desde entonces la diversificación de estas enzimas ha sido enorme. En *P. aeruginosa* sólo se ha detectado la OXA-40, en España (81), y la OXA-198 en Bélgica (82).

- **Enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMA):** se unen a los grupos amino o hidroxilo de los aminoglucósidos, generando compuestos inactivos. En función de la modificación que causan en el aminoglucósido se clasifican en: acetiltransferasas (AAC), adeniltransferasas (ANT), y fosfotransferasas (APH). Se han descrito multitud de EMA diferentes, con perfiles de resistencia complejos y otorgando resistencia de alto nivel a *P. aeruginosa*. Las más frecuentes son las AAC (6')-II (tobramicina \pm amikacina), la AAC (3)-II (gentamicina) la ANT (2')-I (gentamicina y tobramicina). Con frecuencia se produce la asociación de genes que codifican para EMA con β -lactamasas en integrones generando cepas multirresistentes, que conservan únicamente la sensibilidad a ciprofloxacino y colistina (51,52,54,64).

4. Importancia clínica de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es, con diferencia, el patógeno humano más importante dentro de su género, debido a su implicación tanto en infecciones comunitarias como nosocomiales. De forma global, según datos del Estudio EPINE (Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España)-EPPS (*European Point Prevalence Survey*) 2018, en el que han participado 313 hospitales españoles y 60.435 pacientes, constituye el principal patógeno en el 7.9% de las infecciones (comunitarias y relacionadas con la asistencia sanitaria), siendo el tercer microorganismo en frecuencia después de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (83).

A nivel comunitario, *P. aeruginosa* representa el 6.5 % del total de microorganismos aislados en pacientes con infección comunitaria, según datos del estudio EPINE-EPPS 2018 (83). Entre las infecciones adquiridas en la comunidad más habituales destacan la foliculitis y la otitis externa, que suelen cursar con poca gravedad. *P. aeruginosa* también está implicado en infecciones urinarias y oculares. Asimismo, es el principal patógeno responsable de infecciones respiratorias crónicas en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas (84). Aunque de forma bastante inusual, también puede causar neumonía adquirida en la comunidad, afectando principalmente a fumadores expuestos a aerosoles procedentes de reservorios ambientales (85).

Sin embargo, donde *P. aeruginosa* adquiere más importancia es en el ambiente hospitalario, constituyendo una de las causas más frecuentes y grave de infección nosocomial, y uno de los principales patógenos oportunistas en humanos (86). Según datos del estudio EPINE-EPPS 2018, representa el 9.9% de aislamientos en pacientes con infección nosocomial (83). Destaca por ser el principal patógeno implicado en la neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAVIM), estando esta entidad asociada a una tasa de mortalidad elevada (>30%). *P. aeruginosa* también puede causar bacteriemia y sepsis, peritonitis, infecciones del tracto urinario y grandes quemados, alcanzando una elevada mortalidad (1,2). Además, es un problema creciente en las unidades que albergan pacientes en estado crítico y/o inmunodeprimidos. Así, según datos del estudio ENVINE (Estudio Nacional de Vigilancia de la Infección Nosocomial)-HELICS (*Hospitals in Europe Link for Infection Control through Surveillance*) 2018 en UCI, en el que han participado 219 UCIs pertenecientes a 185 hospitales españoles y 27.514 pacientes, *P. aeruginosa* es responsable del 13.6% de las infecciones en estas unidades, siendo el segundo microorganismo en frecuencia por detrás de *E. coli* (87). Su implicación en dicho contexto se justifica porque *P. aeruginosa* rara vez infecta a personas inmunocompetentes o tejidos sanos, de forma que un prerrequisito para sus infecciones suele ser la pérdida de la integridad epitelial, especialmente con un declive de la función inmunológica, sobre todo cuando implica neutropenia (88,89).

5. Bacteriemia por *P. aeruginosa*

Los bacilos Gram-negativos son responsables de casi el 40% de las bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria en España (83). Aunque *P. aeruginosa* no es el microorganismo más frecuente en este contexto, se origina en el entorno hospitalario hasta en un 88% de los casos (90–93), donde supone un serio problema desde el punto de vista clínico, en primer lugar para el paciente, pero también para todos los profesionales que, de una manera u otra, se ven implicados en el proceso diagnóstico y/o terapéutico del paciente. Además, las complicaciones derivadas de la bacteriemia conllevan una larga estancia hospitalaria, incremento del coste sanitario y una importante morbilidad (apartado 5.6). Por el contrario, *P. aeruginosa* es una causa infrecuente de bacteriemia adquirida en la comunidad, representando menos del 3% de los casos (94,95). Sin embargo, los episodios de inicio comunitario podrían estar en aumento, debido a la creciente atención ambulatoria especializada de pacientes complejos y el uso de terapias inmunosupresoras, representando entre el 6-10% de los casos (96–98).

5.1. Epidemiología

Según estudios epidemiológicos realizados sobre la población general, la incidencia global de bacteriemia por *P. aeruginosa* es muy variable según el área geográfica. Así, en EEUU puede llegar a 10.8 casos por 100.000 habitantes-año (91), que contrasta con los 3.2 y 3.6 casos por cada 100.000 habitantes-año observados en Noruega y Alemania, respectivamente (90,99). Su frecuencia en Europa es del 6.1%, siendo el séptimo microorganismo etiológico en este tipo de infección, por detrás de *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulasa-negativos, *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Enterococcus* spp., y *Candida* spp. (100). En España tiene una frecuencia muy similar a Europa. En total, es responsable del 5.4% de las bacteriemias, siendo el quinto microorganismo en frecuencia, después de *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae* según datos del estudio EPINE-EPPS 2018 (83). Dentro de la UCI, su frecuencia es aún mayor, estando implicado en el 7.4% de las bacteriemias primarias, siendo el tercer microorganismo en frecuencia y primer bacilo Gram-negativo, y en el 11.1% de las bacteriemias secundarias, donde se sitúa en tercer lugar, por detrás de *E. coli* y *K. pneumoniae*, según datos del estudio ENVIN-HELICS 2018 (87). Su implicación en dicho contexto está justificada por la mayor frecuencia de inmunodepresión, el mayor uso de antibióticos de amplio espectro y la interrupción de las barreras cutáneo-mucosas con dispositivos invasivos. La edad de presentación es muy variable, pudiendo afectar a cualquier grupo etario, si bien es cierto que la incidencia aumenta claramente con la edad. Es más frecuente en varones, que pueden llegar a representar hasta un 70% de los casos, siendo más llamativa esta diferencia a partir de los 50 años (90,91,99,101).

5.2. Factores de riesgo y origen de la bacteriemia

Existen múltiples factores de riesgo que pueden favorecer la aparición de una bacteriemia por *P. aeruginosa*. Como se ha podido comprobar, el contacto con el sistema sanitario representa uno de los más importantes. Así, tienen mayor riesgo los pacientes de edad avanzada, los que proceden de centros ambulatorios de atención especializada, y los hospitalizados. Hasta el momento, la condición de hospitalización de un paciente conlleva habitualmente la necesidad de diferentes medidas invasivas (catéteres vasculares, catéteres urinarios, ventilación mecánica, etc.). Estos procedimientos no están exentos de complicaciones, pudiendo facilitar el desarrollo de bacteriemia. Además, *P. aeruginosa* suele comportarse como un patógeno oportunista afectando a pacientes complejos, inmunodeprimidos y en situación crítica, por lo que no es raro el antecedente de ingreso en UCI (102). Por este mismo motivo, es frecuente la coexistencia de comorbilidad y/o inmunodepresión de diversos tipos como diabetes mellitus, neoplasias sólidas y hematológicas, así como trasplante de órgano sólido (TOS) y médula ósea (TCMH). También es más frecuente en la neutropenia, tras el uso de quimioterapia y/o de otros inmunosupresores (91,101,103,104). No debe pasarse por alto el tratamiento previo con antibióticos, otro de los principales factores de riesgo para bacteriemia por *P. aeruginosa*. El grupo más importante en este sentido son los β -lactámicos, pero también hay otros que tienen interés, como los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas en el caso de pacientes oncohematológicos (103). El uso de antibióticos puede inducir cambios en la flora intestinal que favorecen la colonización por *P. aeruginosa*, paso previo a la infección en muchos de estos pacientes (105). Otros factores de riesgo para bacteriemias por *P. aeruginosa* son la presencia de enfermedad biliar, la necesidad de hemodiálisis, los grandes quemados y/o el uso de drogas por vía parenteral. En definitiva, se consideran factores de riesgo al desarrollo de bacteriemia por *P. aeruginosa* aquellos que comprometen la integridad de la barrera mecánica epitelial y/o defectos en la inmunidad innata, siendo los más vulnerables los pacientes neutropénicos.

En el caso de *P. aeruginosa*, el porcentaje de bacteriemia en el que no se identifica el origen puede ascender hasta el 40% de los casos y se asocia con mayor frecuencia a la presencia de neutropenia o al uso de catéteres venosos centrales (CVC) (89,106). Cuando se conoce dicho origen, lo más habitual es que se trate de un foco respiratorio, urinario o abdominal (106). En el caso de pacientes con neoplasias, el foco respiratorio es el más frecuente, siendo el origen de la bacteriemia hasta en el 40-60% de los casos (107,108). Ante la presencia de una bacteriemia por un bacilo Gram-negativo, se debe considerar *P. aeruginosa* como el microorganismo más probablemente implicado si el foco es un CVC o una NAVM (101,109).

5.3. Patogénesis y respuesta del huésped

Como se ha desarrollado previamente, la patogénesis de las infecciones agudas invasivas por *P. aeruginosa* (bacteriemia incluida) es multifactorial, pues la virulencia no se puede atribuir a un único determinante. Así, la mayoría de cepas clínicas son invasivas y/o toxigénicas debido a la producción de factores de virulencia de superficie que permiten la adhesión, colonización e invasión, que dañan tejidos o inducen la producción de citoquinas, responsables de la diseminación bacteriana al torrente sanguíneo y de la respuesta inflamatoria sistémica del huésped (110). Frecuentemente, como consecuencia de maniobras diagnósticas y terapéuticas (catéteres vasculares, catéteres urinarios, tubos endotraqueales, etc.), se altera la integridad de la piel y mucosas, lo cual facilita la adherencia y colonización de *P. aeruginosa* a las células del huésped (15). Una vez que las barreras epiteliales o endoteliales se rompen, el sistema inmune innato desencadena la primera línea de defensa con un reclutamiento masivo de neutrófilos que tienen como función eliminar a la bacteria mediante secreción de proteasas con acción bactericida, así como activar la cascada inflamatoria. Otras células del sistema inmune innato, como los macrófagos y las células dendríticas, participan en esta respuesta mediante la fagocitosis o la presentación de antígenos a los linfocitos T que, a su vez, activan a los linfocitos B, liberando anticuerpos específicos frente al antígeno presentado (111).

5.4. Presentación clínica

La gran mayoría de los pacientes con bacteriemia por *P. aeruginosa* sufren un importante deterioro de su situación clínica. La fiebre y otros síntomas típicos de bacteriemia son habituales, siendo similar de la producida por otros bacilos Gram-negativos. Es muy frecuente que se presente con criterios de sepsis y que entre el 25-50% de los casos progrese a shock séptico, requiriendo ingreso en UCI hasta el 28% de los pacientes en algún momento de la evolución (91,101,107). Es por ello que se recomienda clasificar la gravedad clínica inicial del paciente con sospecha de bacteriemia de acuerdo con los criterios internacionales, definidos por la ACCP (*American College of Chest Physicians*)-SCCM (*Society of Critical Care Medicine*) en el año 2016 en sepsis y shock séptico (112). Ambas se producen como resultado de la activación del sistema inmune ante la infección y conlleva una compleja respuesta inflamatoria, en la que se secretan de forma simultánea factores proinflamatorios (factor de necrosis tumoral alfa [TNF- α] e interleuquinas, [IL-1, IL-6 o IL-8]) y antiinflamatorios (IL-10 o IL-3). Se considera que este patrón de respuesta inflamatoria depende tanto de factores dependientes del huésped (edad, comorbilidad, estado inmune, determinantes genéticos, etc.) como del microorganismo (carga bacteriana, virulencia, etc.) (113,114).

5.5. Tratamiento antibiótico

La bacteriemia por *P. aeruginosa* es una entidad grave que requiere atención inmediata y decisiones clínicas adecuadas para lograr una evolución clínica satisfactoria.

5.5.1. Principios generales del tratamiento antibiótico

Los principios que guían la elección del tratamiento antibiótico, ya sea empírico o dirigido, en caso de sospecha o confirmación de bacteriemia por *P. aeruginosa*, son los siguientes (115,116):

- **Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los β -lactámicos:** la mayoría de aislamientos de *P. aeruginosa* sensibles a β -lactámicos presentan una CMI cercana al valor de punto de corte que define su sensibilidad (2-8 mg/L). Por esta razón se recomiendan altas dosis de β -lactámicos, incluso si la cepa se ha definido como sensible *in vitro*. Además, el parámetro farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) que mejor se relaciona con la eficacia clínica y/o microbiológica de los β -lactámicos es el tiempo de exposición del microorganismo al antibiótico o el porcentaje de tiempo que la fracción libre del antibiótico excede la CMI ($fT > CMI$), especialmente cuando la concentración del antibiótico es de 4 veces la CMI (117). En el caso de bacteriemias graves por cepas con valores elevados de CMI, la administración en perfusión continua o extendida de dosis elevadas tienen mayor probabilidad de alcanzar el objetivo de $fT > CMI$. En estas circunstancias, se recomienda iniciar la perfusión continua precedida de un bolus de antibiótico con el fin de alcanzar concentraciones elevadas rápidamente (118). En diferentes estudios clínicos, la infusión continua o extendida de piperacilina-tazobactam, cefepime, ceftazidima o meropenem fue más eficaz que la administración intermitente con respecto a la curación clínica, erradicación microbiológica, duración de la estancia hospitalaria y disminución de la gravedad y/o mortalidad (119–121).
- **Inóculo o carga bacteriana:** en la neumonía, traqueobronquitis purulenta del paciente intubado, peritonitis secundaria, colitis neutropénica e infecciones de piel y tejidos blandos (ectima gangrenoso, pie diabético, quemaduras, etc.), el inóculo bacteriano al inicio del tratamiento antibiótico suele ser alto ($\geq 10^7$ - 10^8 unidades formadoras de colonias, UFC/mL). Este inóculo bacteriano es entre 100 y 1000 veces más alto que el inóculo estándar utilizado en las pruebas de sensibilidad *in vitro*. La actividad intrínseca de la mayoría de antibióticos disminuye cuando la carga bacteriana es alta. En el caso de los β -lactámicos, este efecto podría deberse a una tasa de crecimiento reducida y/o al incremento de la expresión de β -lactamasas debido a la lisis bacteriana (122). Otra consecuencia importante de la presencia de una alta carga bacteriana es el mayor riesgo de selección de mutantes resistentes.

- **Mutaciones y desarrollo de resistencia:** una densidad bacteriana $\geq 10^7$ - 10^8 UFC al inicio del tratamiento implica un alto riesgo de selección de mutantes resistentes por la presión selectiva de antibióticos. Las medidas para contrarrestar este riesgo incluyen: 1) reducción de la carga bacteriana mediante control del foco infeccioso (drenaje, desbridamiento, retirada de catéter, etc.); 2) inicio de la terapia con asociaciones de antibióticos (β -lactámico + aminoglucósido, β -lactámico + fluoroquinolonas, etc.) que no comparten el principal mecanismo de resistencia, disminuyendo así la probabilidad de mutantes resistentes a dos antibióticos simultáneamente; y 3) uso de dosis y/o vías de administración capaces de generar una concentración mayor que la CMI para potenciales mutantes resistentes, denominada concentración preventiva de mutantes (CPM) (123).
- **Importancia del tratamiento antibiótico empírico adecuado:** diversos estudios realizados en pacientes con bacteriemia por *P. aeruginosa* han demostrado altas tasas de mortalidad cuando el tratamiento empírico inicial no es adecuado (97,98,124–127). La importancia del tratamiento empírico podría depender del estado inmunológico del paciente, de la gravedad de la presentación y del foco primario de la bacteriemia. Dada la prevalencia actual de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a β -lactámicos, el inicio del tratamiento con un β -lactámico asociado a un aminoglucósido, fluoroquinolona o colistina (según las tasas de resistencia local) aumenta la probabilidad de adecuación del esquema empírico inicial (127,128).
- **Valor del tratamiento combinado frente a monoterapia:** por lo general, la asociación de un β -lactámico y un aminoglucósido muestra actividad sinérgica *in vitro*. Sin embargo, en la práctica clínica, la sinergia potencial de esta asociación no parece implicar una mejora significativa en el pronóstico y conlleva un riesgo de nefrotoxicidad por el aminoglucósido (107,129–131). La evidencia disponible sugiere que el mayor beneficio de una terapia combinada deriva de la mayor probabilidad de elegir un antibiótico adecuado durante la terapia empírica, de prevenir la resistencia durante la terapia definitiva y/o de beneficiarse de la actividad sinérgica *in vitro* (116).
- **Nuevos antibióticos:** entre ellos cabe destacar las nuevas combinaciones de β -lactámico-inhibidor de β -lactamasas (132–135): 1) **ceftolozano-tazobactam**, que ha demostrado tener una potente actividad *in vitro* frente a la mayoría de cepas multirresistentes (pero no frente a cepas productoras de BLEE y carbapenemasas), y está aprobado para infecciones complicadas del tracto urinario e intraabdominales; y 2) **ceftazidima-avibactam**, altamente efectivo frente a cepas multirresistentes (incluyendo BLEE y carbapenemasas de clase A y D, pero no frente a MBL), y que está aprobado para infecciones complicadas del tracto urinario, intraabdominales y NAVM. Avibactam restaura la actividad de aztreonam frente a MBL.

5.5.2. Tratamiento antibiótico empírico

La selección empírica del tratamiento antibiótico más apropiado para una posible bacteriemia por *P. aeruginosa* se basa en: 1) presencia de criterios de gravedad y 2) presencia de factores de riesgo de infección por cepas que albergan mecanismos de resistencia (**Figura 5**) (115). Los β -lactámicos forman la columna vertebral del tratamiento empírico antipseudomónico (116).

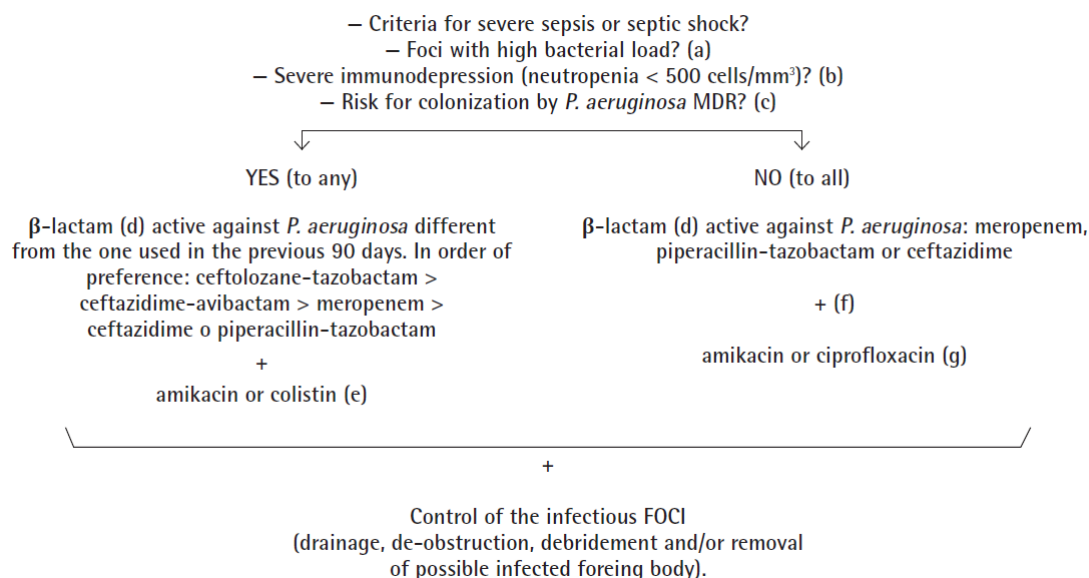


Figura 5. Elección del tratamiento antibiótico empírico activo frente a *P. aeruginosa*. (a) Alta carga bacteriana no corregible quirúrgicamente (neumonía extensa o con cavitación); (b) Incluye neutropenia < 500 células/mm³ y tratamiento con dosis de corticoides > 20 mg/Kg > 3 semanas; (c) Tratamiento en los últimos 30-90 días con un β -lactámico activo contra *P. aeruginosa*, ingreso durante $> 3-5$ días en una unidad de hospitalización con una prevalencia de cepas multirresistentes $> 10-20\%$ o historia previa de colonización/infección por *P. aeruginosa* multirresistente; (d) Dosis de carga inicial seguida de altas dosis administradas como infusión continua (o prolongada) durante las primeras 48-72 horas; (e) Según epidemiología local y la sensibilidad de posibles aislamientos previos; (f) Monoterapia en caso de infección del tracto urinario o infección del catéter venoso. Asociación con amikacina o ciprofloxacino en situaciones con alta carga bacteriana (neumonía); (g) Ciprofloxacino como tratamiento de elección para otitis externa maligna, prostatitis e infección bronquial en pacientes con fibrosis quística. Tomado de Mensa *et al.* (115).

En cualquiera de las situaciones anteriores, el control adecuado del foco infeccioso (drenaje, desbridamiento, retirada de catéter, etc.) es crítico. Una vez que los resultados del cultivo y el antibiograma estén disponibles, el tratamiento debe ajustarse a la sensibilidad del aislamiento. Si se confirma la infección por *P. aeruginosa* y la evolución clínica es favorable, desde las 72 horas en adelante el tratamiento puede continuarse en monoterapia con un β -lactámico elegido de acuerdo con el antibiograma. Si todos los cultivos son negativos y la evolución clínica es favorable, a partir de las 72 horas de tratamiento puede continuarse con monoterapia con el β -lactámico inicial (115).

5.5.3. Tratamiento antibiótico dirigido

La elección del tratamiento antibiótico cuando se conoce el perfil de sensibilidad de la cepa aislada de *P. aeruginosa* se puede hacer de acuerdo con las siguientes recomendaciones (115):

- **Cepa resistente a la mayoría de los β -lactámicos, pero sensible a ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam:** en estas cepas la CMI de ceftolozano-tazobactam es a menudo de 2-4 mg/L, por lo que este antibiótico es un posible tratamiento. En el caso de cepas productoras de BLEE o carbapenemasas de clase A (GES, KPC, etc.) se puede utilizar ceftazidima-avibactam. En caso de cepas productoras de MBL o carbapenemasas de clase B (VIM, IMP, NDM, etc.) las opciones terapéuticas se limitan al uso de asociaciones de aztreonam con ceftazidima-avibactam con o sin colistina.
- **Cepa resistente a uno de los β -lactámicos activos:** en caso de resistencia a ceftazidima y/o piperacilina-tazobactam, las opciones de tratamiento pueden ser ceftolozano-tazobactam, ceftazidima-avibactam o meropenem. La elección depende del riesgo de aparición de resistencia, que, a su vez como ya se ha comentado, está relacionado con la carga bacteriana esperada en el foco infeccioso. Así pues, si la bacteriemia implica una alta carga bacteriana (neumonía), se aconseja dar prioridad al antibiótico que tiene mayor probabilidad de superar la CPM, en este caso ceftolozano-tazobactam. Meropenem puede usarse para infecciones urinarias o de catéteres vasculares. En caso de resistencia a meropenem, el tratamiento puede ser ceftolozano-tazobactam, ceftazidima o piperacilina-tazobactam.
- **Cepa sensible a todos los β -lactámicos:** en este caso, las opciones de tratamiento pueden ser ceftazidima, piperacilina-tazobactam o meropenem. Sin embargo, en bacteriemias secundarias a NAVM, neumonías graves en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas y neumonía con cavitación, se debe considerar el tratamiento con ceftolozano-tazobactam debido al alto riesgo de aparición de resistencias. En cualquiera de las situaciones anteriores, en caso de shock séptico y en pacientes neutropénico, durante las primeras 48-72 horas del tratamiento dirigido, se puede añadir un antibiótico adicional (aminoglucósido, fluoroquinolona, etc.), en función de la sensibilidad de la cepa. Los antibióticos inhalados (tobramicina, colistina o aztreonam) están reservados para neumonía grave y/o cuando el paciente está intubado o sufre una patología pulmonar crónica.

El foco meníngeo plantea dos problemas adicionales: 1) difusión de los antibióticos a través de las leptomeninges y 2) riesgo de encefalopatía asociada con dosis elevadas de β -lactámicos (cefepime, ceftazidima o imipenem). En este caso el tratamiento puede realizarse con meropenem o ceftazidima asociado o no a ciprofloxacino, amikacina o colistina (136).

5.6. Mortalidad y factores pronósticos

A pesar de los avances médicos, la mortalidad secundaria a la bacteriemia por *P. aeruginosa* continúa siendo elevada, con tasas en torno al 30% (21,90,91,103,124,125,130,137,138), y siendo ésta superior a la de otros microorganismos (96,106,139–141). El pronóstico de la bacteriemia por *P. aeruginosa* es el resultado de una compleja interacción entre varios factores dinámicos que operan a nivel del huésped, el microorganismo, y el tratamiento (142). Esto incluye las comorbilidades subyacentes, el estado inmune del huésped, la virulencia del microorganismo y su resistencia a los antibióticos, y la terapia antimicrobiana (143) (**Figura 6**).

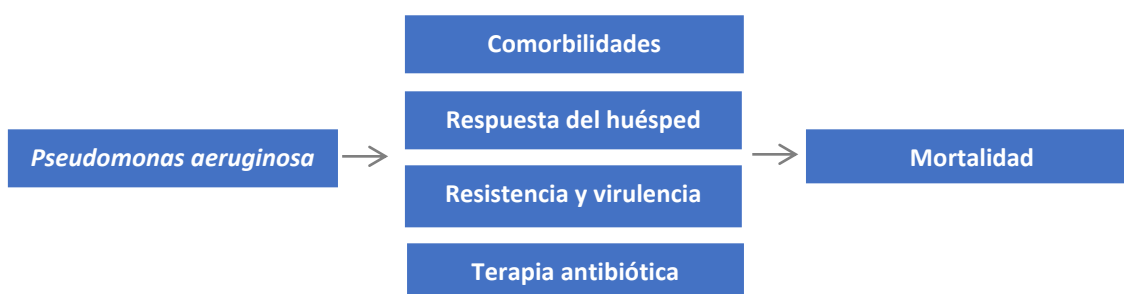


Figura 6. Factores que contribuyen en la mortalidad de las infecciones por *P. aeruginosa*.

5.6.1. Factores relacionados con el huésped

Lo más habitual es que la mortalidad se asocie con la edad avanzada (90,99,101). Sin embargo, algún estudio muestra una tendencia a mayor mortalidad a corto plazo (en los primeros 28 días) en pacientes jóvenes, asociándola a un mayor porcentaje de bacteriemias nosocomiales, mayor prevalencia de inmunodepresión y menor proporción de bacteriemias de origen urinario (91). No resulta extraño que los pacientes con mala situación funcional basal tengan una mayor mortalidad. Uno de los índices que más se utilizan en los estudios, el índice de comorbilidad de Charlson (144), también se ha implicado estrechamente con la mortalidad (90,97,138). La inmunodepresión es asimismo un importante factor pronóstico. En este sentido destaca el antecedente de neoplasia hematológica y la presencia de neutropenia (103,107,108,145). Aunque los datos varían de unos estudios a otros, los focos con mayor mortalidad son el respiratorio, el desconocido y el abdominal, por lo que con frecuencia las bacteriemias secundarias a dichos orígenes se denominan de alto riesgo (21,90,124,125,129,137,146,147). Además, la mortalidad de la bacteriemia por *P. aeruginosa* se concentra en los primeros días tras su inicio. Por ello, uno de los factores pronósticos más importantes es el desarrollo de shock séptico (98,124,125,137,146–148). En múltiples estudios se utiliza el índice de bacteriemia de Pitt (149), el *sequential organ failure assessment* (SOFA) y el *acute physiology and chronic health evaluation II* (APACHE II) como marcadores de la mortalidad (91,97,124,137,138,148,150).

5.6.2. Factores relacionados con el microorganismo

La asociación entre la resistencia a los antibióticos y la mortalidad se ha documentado en varias ocasiones. Habitualmente, dicha asociación se ha observado en cepas resistentes a algunos antibióticos de uso frecuente, como los carbapenémicos (150–153). También se ha constatado un peor pronóstico con cepas multirresistentes (20,125,154–156). Sin embargo, la relación entre la multirresistencia y la mortalidad sigue siendo un tema de controversia, ya que ésta no ha podido demostrarse en un número importante de estudios (90,137,146,148,157). En cualquier caso, lo que continúa siendo difícil de esclarecer es si el aumento de mortalidad que se ha observado en estas cepas se debe a la propia virulencia de la cepa o a la mayor probabilidad de que el tratamiento instaurado sea inadecuado. En este sentido, como es lógico, la probabilidad de que una cepa multirresistente no sea tratada adecuadamente desde el inicio es muy elevada, lo cual podría asociarse con un peor pronóstico (125,146,150,153–155). El problema que presentan ambas variables, es que tienen una importante colinealidad y es difícil que ambas resulten predictores independientes de mortalidad en los análisis multivariantes. Asimismo, el supuesto coste biológico asociado a la multirresistencia forma parte de esta controversia (apartado 6.5). Otros factores bacterianos que podrían tener interés son el tiempo hasta positividad del hemocultivo, como marcador subrogado del inóculo bacteriano (158,159), y la existencia de algunos factores de virulencia, como las toxinas del SST3, principalmente ExoU, que ha mostrado ser un predictor independiente de mortalidad (20,22).

5.6.3. Factores relacionados con el tratamiento antibiótico

La instauración de un tratamiento antibiótico empírico adecuado es un factor pronóstico importante (97,124–127,131,137,138,150,154). El tratamiento antibiótico dirigido también se ha documentado como factor pronóstico, pero en menor medida que el empírico (124,137). Sin embargo, no se ha demostrado que ningún antibiótico en concreto mejore el pronóstico de los pacientes con bacteriemia por *P. aeruginosa*. En general, se considera prioritario el inicio precoz de un tratamiento empírico adecuado, ya que el retraso en el mismo se asocia a un aumento de la mortalidad. La administración temprana de un antibiótico apropiado tiene una relevancia especial cuando la bacteriemia presenta criterios de gravedad clínica, el paciente presenta inmunodepresión, y en casos de foco respiratorio o abdominal (145,147,150). A pesar de todo, existe un número importante de publicaciones donde no se ha conseguido demostrar que el tratamiento antibiótico empírico sea tan determinante (21,130,156,160). Asimismo, en el momento de la presente revisión, no existen datos convincentes que demuestren un beneficio en la mortalidad de la terapia combinada frente a la monoterapia.

6. Multirresistencia en *P. aeruginosa*

En este punto, conviene definir multirresistencia, para lo cual se puede seguir la clasificación propuesta por Magiorakos *et al.* (161) en 2012, donde una cepa puede ser: 1) **multirresistente** (*multidrug-resistant*, MDR), cuando es resistente a uno o más antibióticos de tres o más categorías de antimicrobianos; 2) **extremadamente resistente** (*extensively drug-resistant*, XDR), si es resistente a uno o más antibióticos de todas las categorías de antimicrobianos, excepto de dos o menos; y 3) **panresistente** (*pandrug-resistant*, PDR), en caso de ser resistente a todos los antibióticos de todas las categorías de antimicrobianos (**Tabla 4**).

Tabla 4. Categorías de antibióticos activos frente a *P. aeruginosa*.

Categoría de antibióticos	Agente antibiótico ¹
Ácidos fosfónicos	Fosfomicina
Aminoglucósidos	Amikacina, gentamicina, netilmicina y tobramicina
Carbapenémicos	Doripenem, imipenem y meropenem
Cefalosporinas	Ceftazidima y cefepime
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino y levofloxacino
Monobactámicos	Aztreonam
Penicilinas + inhibidores de β -lactamasas	Piperacilina-tazobactam y ticarcilina-ácido clavulánico
Polimixinas	Colistina y polimixina B

¹Antibióticos utilizados para definir la clasificación en *P. aeruginosa*. Tomado de Magiorakos *et al.* (161).

6.1. Situación actual y gravedad del problema

La prevalencia de cepas MDR de *P. aeruginosa* está aumentando en los últimos años, de forma que actualmente constituyen del 15 al 30% de los aislados en muchas áreas. Además, una importante proporción de las cepas MDR cumplen los criterios XDR, lo que limita aún más las opciones de tratamiento antibiótico disponibles (162–166). Como ejemplo, en un estudio multicéntrico reciente (2017) a gran escala (51 hospitales) de infecciones por *P. aeruginosa* realizado en España, se demostró que el 26% de los aislamientos eran MDR, y el 65% de ellos (17% del total de aislamientos) cumplían criterios XDR, siendo la mayoría únicamente sensibles a colistina y/o amikacina (166). De hecho, en muchos hospitales de todo el mundo, los aislamientos únicamente sensibles a colistina no son infrecuentes (73). Sin embargo, la prevalencia de la resistencia a los nuevos antipseudomónicos ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam no se han considerado en la mayoría de estos estudios. Si bien la prevalencia de resistencia a estas nuevas opciones terapéuticas es inferior al 10%, existe una variación geográfica considerable dependiendo de la prevalencia de mecanismos de resistencia adquiridos como BLEE y carbapenemasas (71,167,168).

Actualmente, *P. aeruginosa* se encuentra entre los seis patógenos que forman parte del grupo ESKAPE (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter* spp.). El concepto ESKAPE se ha utilizado para enfatizar que estos microorganismos son los responsables de la mayoría de las infecciones nosocomiales a nivel mundial y son paradigma de patógenos capaces de desarrollar resistencias y “escapar” de los tratamientos antibióticos habituales (169,170). Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha denominado recientemente a *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos como un patógeno de prioridad crítica (prioridad 1) debido fundamentalmente a su asociación con un aumento de la mortalidad y al desarrollo de una mayor resistencia durante el tratamiento antibiótico (171,172).

Según los datos del último informe anual de 2017 de la Red Europea de Control de la Resistencia Antimicrobiana (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*, EARS-Net) publicado por el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (*European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) (<http://ecdc.europa.eu>), que incluye los datos de los países de la Unión Europea (UE) y el Espacio Económico Europeo (EEE) (173), la mayoría de países presentó porcentajes de resistencia en *P. aeruginosa* por encima del 10% (entre el 10% y el 25% en España) para todos los grupos de antibióticos sometidos a vigilancia (piperacilina-tazobactam, carbapenémicos, ceftazidima, fluoroquinolonas y aminoglucósidos). Además, fue común la aparición de resistencia combinada, con un 18.3% de los aislados resistentes a al menos tres grupos de los antibióticos examinados (**Figura 7**).

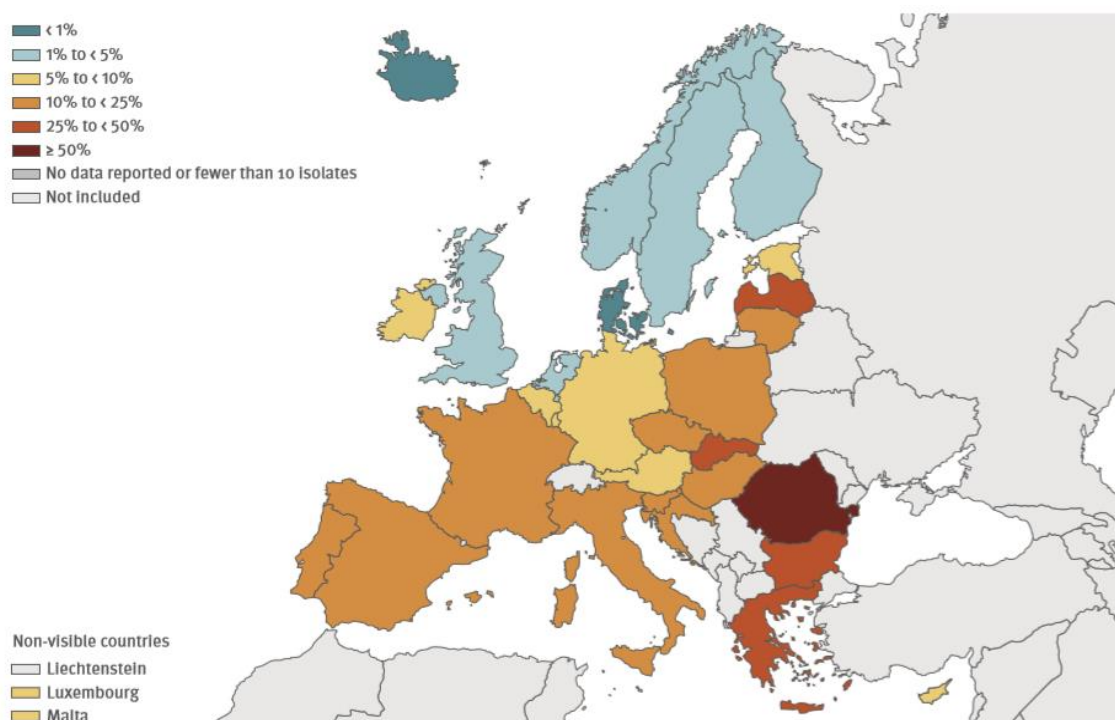


Figura 7. Distribución de aislados de *P. aeruginosa* resistentes por países de la UE/EEE en 2017. Resistencia combinada a tres o más de los antimicrobianos. Tomado del informe anual EARS-Net (173).

6.2. Clones epidémicos de alto riesgo

Durante los últimos años, multitud de publicaciones han alertado de la aparición de brotes epidémicos nosocomiales de *P. aeruginosa* MDR/XDR, que se consideraban circunscritos a cada hospital (174–176). Sin embargo, estudios posteriores comprobaron que la mayoría de estos clones no se encontraban limitados a un único hospital, sino que presentaban una distribución más amplia de lo que inicialmente se había considerado (73,79,177). Investigaciones más recientes han avanzado en este aspecto demostrando la existencia de clones MDR/XDR de *P. aeruginosa* diseminados por hospitales de todo el mundo, los cuales han sido denominados clones de alto riesgo (*high-risk clones*) o clones epidémicos, y destacan por ser muy exitosos dentro del ambiente hospitalario en el contexto de la infección nosocomial (55,178–180).

6.2.1. Caracterización de los clones de alto riesgo

Actualmente, el método estandarizado más utilizado para el análisis de la estructura poblacional de *P. aeruginosa* es el esquema de tipificación multilocus de secuencias (*multilocus sequence typing*, MLST), publicado por Curran *et al.* (181). Este método se basa en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de siete genes conservados de *P. aeruginosa*: *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* y *trpE*. La base de datos de MLST de *P. aeruginosa* (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>) contiene actualmente más de 6.800 aislados que generan cerca de 3.300 tipos de secuencia (*sequence types*, ST), correspondientes a diferentes perfiles alélicos constituidos por combinaciones específicas de alelos de los siete genes analizados. Según los análisis realizados sobre la base de datos MLST (55), *P. aeruginosa* presenta una importante diversidad clonal, pero ésta afecta fundamentalmente a las cepas sensibles que presentan un patrón policlonal no endémico. Por el contrario, al analizar las cepas de *P. aeruginosa* con perfil MDR, y particularmente con fenotipo XDR, no existe tal diversidad, sino que la mayoría de los aislamientos pertenecen a unos pocos clones endémicos. Así, unos pocos genotipos de *P. aeruginosa*, fundamentalmente los clones ST111 (serotipo O12), ST175 (serotipo O4) y ST235 (serotipo O11), son los responsables de la mayoría de las infecciones nosocomiales por *P. aeruginosa* MDR/XDR a nivel mundial (55). A modo de ejemplo, en un estudio reciente multicéntrico español de bacteriemia por *P. aeruginosa*, Peña *et al.* (20) demostraron que el 28% de los aislados eran MDR y el 52% de los mismos (15% del total) cumplía los criterios de XDR. Además, este estudio reveló que casi todas las cepas sensibles estaban representadas por genotipos únicos, mientras que la diversidad clonal era mucho menor entre las cepas MDR/XDR que pertenecían a solo tres clones, correspondientes a los principales clones MDR/XDR de alto riesgo internacional ST111, ST175 y ST235.

6.2.2. Determinantes asociados a los clones de alto riesgo

A la hora de analizar el éxito de los clones de alto riesgo de *P. aeruginosa*, hay que considerar factores como la resistencia antibiótica y la virulencia. En el caso de la resistencia, estos clones de alto riesgo se caracterizan por tener una capacidad excepcional de adquirir determinantes de resistencia por transferencia genética horizontal, particularmente BLEEs y carbapenemasas, lo que favorece que se asocian a fenotipos MDR/XDR. También existe habitualmente una asociación entre determinados clones de alto riesgo, como el ST175, y ciertas mutaciones cromosómicas en *oprD* (Q142X) y *ampR* (G154R) que le confieren resistencia (182,183). Pero deben de existir otros factores adicionales, ya que no todos los aislados MDR/XDR se convierten en clones de alto riesgo internacionales. Con respecto a la virulencia, tal y como se tratará más adelante, suele darse una relación inversa entre la misma y la resistencia, de forma que la adquisición de un gran nivel de resistencia implicaría un coste a nivel de *fitness* y virulencia (184). Así, en un estudio reciente, los clones MDR/XDR ST111, ST175 y ST235 fueron defectuosos para las motilidades *swimming*, *swarming* y *twitching* y la producción de pioverdina y piocianina, y mostraron, además, un *fitness* reducido en experimentos *in vitro* (185). Por otro lado, uno de los factores de virulencia más importantes en *P. aeruginosa*, como se vio anteriormente, es el SST3, así que es esperable que estos clones de alto riesgo estén asociados a genotipos SST3 específicos. Efectivamente, el estudio multicéntrico español de Peña *et al.* (20), reveló que los clones de alto riesgo ST111 y ST175 mostraban el genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁺. Por el contrario, el clon de alto riesgo ST235 mostró el genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻, siendo un factor de riesgo independiente para la mortalidad temprana en bacteriemia por *P. aeruginosa*.

6.2.3. Epidemiología de los clones de alto riesgo

Dentro de los clones de alto riesgo, el clon ST235 es el que presenta una distribución más amplia, habiéndose aislado en todos los continentes. Dicho clon es el que presenta mayor relación con la adquisición de genes de resistencia por transferencia horizontal, habiéndose asociado a diferentes BLEEs y carbapenemasas (GES-5, VIM-1, IMP-1, etc.) (55,179,180). Además, estudios recientes han demostrado su asociación con una mayor virulencia al presentar el genotipo de virulencia *exoU*⁺ del SST3 (18,186). El clon ST111 también muestra una distribución mundial, encontrándose en todos los continentes, excepto Oceanía. La distribución del clon ST175 es más limitada, estando confinado fundamentalmente a Europa y Japón. En España, el clon de alto riesgo más frecuente es el ST175, y su perfil de resistencia deriva en la mayoría de los casos de la combinación de varios mecanismos de resistencia (*OprD* y *AmpC*), y en menor medida de la adquisición horizontal de BLEEs y carbapenemasas (VIM-2, VIM-20, GES-5, etc.) (165,166).

6.3. Evolución de la multirresistencia en el Hospital Universitario 12 de Octubre

En la última década, se ha objetivado en el Hospital Universitario 12 de Octubre un aumento progresivo de los aislamientos de *P. aeruginosa* MDR/XDR, con unos porcentajes mantenidos de multirresistencia en torno al 30% en los últimos cinco años (**Figura 8**).

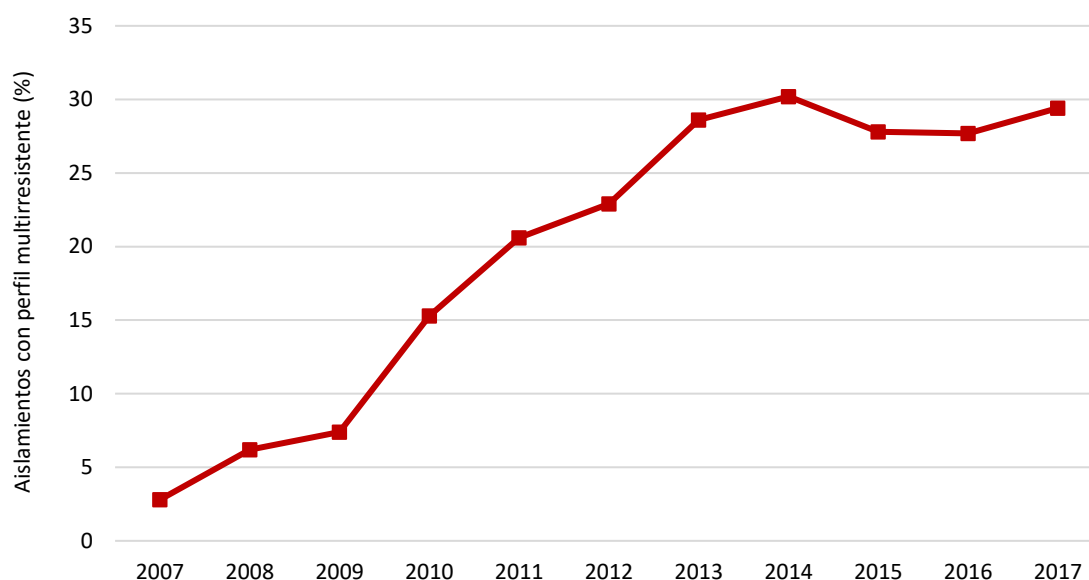


Figura 8. Evolución de *P. aeruginosa* multirresistente en el Hospital Universitario 12 de Octubre.

En el Hospital Universitario 12 de Octubre se constató a partir de 2007 un incremento en la prevalencia de aislamientos por *P. aeruginosa* MDR/XDR pasando del 3% en 2007 a un 15% en 2010. El estudio de la epidemiología molecular de los aislamientos MDR/XDR de *P. aeruginosa*, de ese periodo, reveló que el incremento en la prevalencia de la multirresistencia de *P. aeruginosa* se debía fundamentalmente a la emergencia de dos clones: 1) **clon ST235**, que presentó un fenotipo de resistencia tipo XDR, únicamente sensible a colistina. Los mecanismos de resistencia adquirida incluían, entre otros, una carbapenemasa duplicada de clase A (GES-1/GES-5) y EMA (AACA4, AADA1 y AAC (6')) alojados en el integrón In647. Esta cepa epidémica persistió desde marzo de 2007 a enero de 2010, presentando su máximo pico en el segundo trimestre de 2008 para llegar a desaparecer a partir del segundo trimestre de 2010. Este clon fue responsable de un brote intrahospitalario en pacientes del Servicio de Hematología y causó una elevada mortalidad (73); y 2) **clon ST175**, con fenotipo MDR, únicamente sensible a aztreonam, amikacina y colistina. La caracterización molecular de los mecanismos de resistencia adquirida reveló, entre otros, la presencia de una carbapenemasa tipo MBL (VIM-2) y EMA (AAC (6')-Ib), alojados en el integrón In41. Este clon se ha mantenido de forma sostenida en nuestra institución a lo largo de los últimos años en una situación de endemia persistente (79).

6.4. Impacto clínico de la multirresistencia

A pesar de este aumento de cepas MDR/XDR producido en los últimos años, el impacto de la multirresistencia en el pronóstico de los pacientes sigue siendo un tema en controversia. En general, se asume que las infecciones producidas por *P. aeruginosa* MDR/XDR están asociadas a un peor pronóstico. Diversos estudios clínicos han identificado una asociación entre la multirresistencia y una mayor frecuencia de factores pronósticos adversos, tales como mayor mortalidad, aumento en la estancia hospitalaria e incremento del coste sanitario (139,187–189). Sin embargo, la contribución de una posible mayor virulencia del patógeno frente a otros factores relacionados con la multirresistencia, pero independientes del microorganismo, no está clarificada ya que los estudios al respecto presentan sesgos diversos (escaso tamaño muestral, diferencias en la población de estudio, definiciones variables de multirresistencia, etc.) que impiden extraer conclusiones definitivas. Y lo que es más importante, el pronóstico de la infección viene determinado no sólo por factores dependientes del microorganismo (carga bacteriana, virulencia, etc.) sino por factores dependientes del huésped (edad, comorbilidad subyacente, inmunidad, etc.) y del tratamiento antibiótico (idoneidad, precocidad de la administración, etc.) (142,143). Así, los pacientes con infecciones debidas a *P. aeruginosa* MDR/XDR suelen presentar más comorbilidad, lo que puede condicionar una mayor mortalidad (151). Además, una de las principales consecuencias de la multirresistencia es la dificultad de seleccionar un tratamiento empírico adecuado. Los pacientes con infecciones producidas por *P. aeruginosa* MDR/XDR tienen mayor riesgo de recibir una terapia antibiótica inicial inadecuada, asociándose el retraso en la terapia antibiótica efectiva con una mayor mortalidad (124,127).

Diferentes estudios han intentado analizar el impacto negativo que la multirresistencia pudiera tener sobre el pronóstico de los pacientes. Algunos autores han observado una asociación entre la mortalidad y la multirresistencia (20,125,154,155), pero sin profundizar en una relación causal entre ambos. Por el contrario, varios estudios han demostrado que la mortalidad en infecciones por *P. aeruginosa* MDR/XDR es similar a la producida por cepas sensibles (146,151), a pesar de recibir los pacientes con cepas resistentes un tratamiento inadecuado con mayor frecuencia, lo que sugeriría de forma indirecta una mayor virulencia de las cepas sensibles. Por lo tanto, la cuestión sobre las consecuencias clínicas de la multirresistencia, más concretamente su repercusión en la mortalidad, permanece sin respuesta. Desde un punto de vista práctico, este aspecto es de gran importancia para guiar las estrategias de control de la diseminación de la multirresistencia y el diseño de las políticas de tratamiento antibiótico. Dadas las dificultades que conlleva el análisis de este problema desde un punto de vista exclusivamente clínico, la utilización de estudios experimentales será de gran utilidad, como se comentará más adelante.

6.5. Multirresistencia frente a coste biológico

Tanto la invasión del huésped y la resistencia ante su sistema inmune como el tratamiento antibiótico son condiciones ambientales adversas para *P. aeruginosa*, de manera que puede considerarse que tanto la virulencia como la adquisición de resistencia antibiótica son mecanismos adaptativos de respuesta al estrés en este contexto (190). Sin embargo, debido a las complejas interconexiones existentes entre el metabolismo bacteriano, muchos genes están involucrados en varios de los circuitos de regulación, por lo que la adquisición de mutaciones de resistencia puede producir un coste fisiológico para la bacteria que conduce a una reducción de su *fitness*, lo que se conoce como coste biológico asociado a la resistencia (184,191,192). Este coste metabólico es debido a que los antibióticos frecuentemente actúan sobre elementos claves de la regulación bacteriana, como son la transcripción de material genético, la síntesis de proteínas o de la pared celular (193). Así, cuando la bacteria adquiere resistencia por mutación, se producen cambios en su capacidad de regulación, perdiendo o empeorando alguna de estas funciones que le son imprescindibles, y, por tanto, suponiendo una carga metabólica para la bacteria. Esta carga metabólica podría eventualmente comprometer la virulencia de la bacteria al afectar a su *fitness*, así como limitar su capacidad de expresar determinantes de virulencia.

Hay numerosos estudios que evidencian la existencia de un coste biológico asociado a la multirresistencia (33,194–196). En este sentido, algunos autores han propuesto que, debido a dicho coste biológico, las cepas resistentes podrían estar en desventaja a la hora de competir con las cepas sensibles en ausencia de presión antibiótica (197). Sin embargo, otros autores postulan que las bacterias resistentes son capaces de evolucionar y adaptarse para compensar la pérdida de *fitness*. Según esta hipótesis, el coste biológico asociado a la multirresistencia se vería atemperado mediante mecanismos de compensación secundarios que conseguirían restaurar el *fitness* inicial de la bacteria sin perder resistencia (191,192,198). En este sentido, algunas cepas pueden acumular mutaciones que compensen el efecto de la resistencia sobre su metabolismo, como sería el caso de mutaciones supresoras que restauren o sustituyan por una vía alternativa las funciones que habían sido alteradas por la mutación que produjo la resistencia. Existen, además, cepas en las que ciertas mutaciones pueden coseleccionar incrementos de resistencia y virulencia. Algunos ejemplos lo constituyen: 1) **sistemas de expulsión activa**, algunos de los cuales pueden expulsar antibióticos y señales de QS que estimulan la transcripción de factores de virulencia; 2) **mutantes del gen *OprD***, asociados a un incremento en la resistencia a carbapenémicos y de la citotoxicidad e invasividad en modelos murinos; y 3) **plásmidos de virulencia**, que alojan a la vez genes de resistencia y virulencia, permitiendo así su coselección y adaptación a las condiciones particulares del medio (143).

7. Estudios experimentales de virulencia en *P. aeruginosa*

Los estudios experimentales han contribuido históricamente al conocimiento de la patogénesis de las enfermedades infecciosas y al desarrollo de estrategias terapéuticas para su tratamiento. Sin duda alguna, estos estudios ofrecen incuestionables ventajas metodológicas como su reproducibilidad, la posibilidad de homogeneizar los grupos, de estudiar las variables en función de objetivos, o de adaptar la muestra al diseño estadístico. Los estudios experimentales *in vitro* ofrecen una primera aproximación pudiendo reproducir partes de organismos biológicos más complejos y permiten obtener información de forma relativamente rápida y reproducible, pero tienen limitaciones importantes ya que en muchas ocasiones los aspectos clínicos no pueden ser simulados de forma adecuada, por lo que puede haber dificultades a la hora de trasladar la información obtenida a la realidad clínica. De aquí se deduce la importancia que se concede a los estudios experimentales *in vivo*, que intentan dar respuesta a preguntas que surgen en la práctica clínica y representan un paso esencial entre los estudios *in vitro* y los estudios clínicos.

7.1. Justificación del uso de estudios experimentales

Como se ha comentado previamente, la gran variabilidad genética de *P. aeruginosa* como consecuencia de la adquisición de múltiples mecanismos de resistencia y factores de virulencia, hacen de este microorganismo uno de los patógenos mejor adaptados para la colonización, infección y persistencia en el hombre. Pero es precisamente esta variabilidad genética la que nos hace preguntarnos si su virulencia es consecuencia del conjunto sinérgico de sus determinantes patogénicos o si alguno de estos componentes tiene mayor peso en su capacidad para generar cuadros clínicos de gravedad y en consecuencia mayor mortalidad. Los estudios clínicos encaminados a responder dicha pregunta han tropezado con diversos sesgos (muestras clínicas pequeñas, diferencias entre las poblaciones de estudio, definiciones variables de multirresistencia, etc.) que impiden obtener conclusiones definitivas. Por otra parte, la investigación clínica puede verse artefactada por las características del huésped (comorbilidades, inmunidad, origen de la infección, presentación clínica, etc.) y el tratamiento antibiótico. Es por ello cuando surge la necesidad de recurrir a estudios experimentales *in vitro* e *in vivo* para el estudio de la virulencia bacteriana. Esta aproximación se ha evaluado recientemente en un modelo murino de peritonitis por *P. aeruginosa* (186). Sin embargo, la utilidad de los modelos murinos para el análisis de grandes colecciones de aislamientos con diferentes características microbiológicas está limitada por el coste, la carga de trabajo y las restricciones éticas. En este sentido, *P. aeruginosa* causa infecciones letales no solo a los mamíferos, sino también a animales invertebrados como el nematodo *Caenorhabditis elegans*.

Diversos estudios en microbiología avalan la idoneidad de *C. elegans* como modelo animal para el estudio de la biología del desarrollo y las interacciones patógeno-huésped (200–202). *C. elegans* se usa a menudo como huésped debido a su profunda caracterización y simplicidad experimental (203,204). Además, este modelo de infección ofrece muchas ventajas prácticas, como el bajo coste, permite realizar *screening* a gran escala y no plantea cuestiones éticas (200,205,206). En el caso concreto de *P. aeruginosa*, estudios previos postulan la posibilidad de que la patogénesis de las infecciones por este microorganismo no sólo se deba a uno u otro factor de virulencia, sino que el perfil de resistencia y los clones de alto riesgo podrían ser determinantes en el desarrollo de su patogenia. En estos estudios, Sánchez-Diener *et al.* (207,208) documentaron una clara correlación inversa entre la resistencia y la virulencia en el modelo *C. elegans*. Observaron que la menor virulencia se relacionaba con los perfiles de resistencia MDR/XDR. Sin embargo, dentro de ellos, el clon de alto riesgo ST235 producía una actividad nematocida bastante superior que los clones ST111 y ST175, atribuyéndose ésta a la secreción del genotipo *exoU* del SST3. De hecho, establecieron la virulencia del modelo *C. elegans* como un marcador de peor pronóstico en pacientes con bacteriemia por *P. aeruginosa* (208), pero otros marcadores patogénicos como la motilidad o la producción de pigmentos no fueron esenciales para la virulencia de *P. aeruginosa* en este modelo (207).

P. aeruginosa produce letalidad en *C. elegans* a través de dos mecanismos principales (**Figura 10**): 1) la colonización intestinal puede dar lugar a una letalidad lenta por la participación del sistema QS y diversos factores de virulencia y 2) *P. aeruginosa* puede producir letalidad rápida en las primeras 24 horas mediante la secreción de diferentes toxinas. Estos dos mecanismos se han utilizado para establecer ensayos de letalidad lenta y rápida de *P. aeruginosa* (209,210).

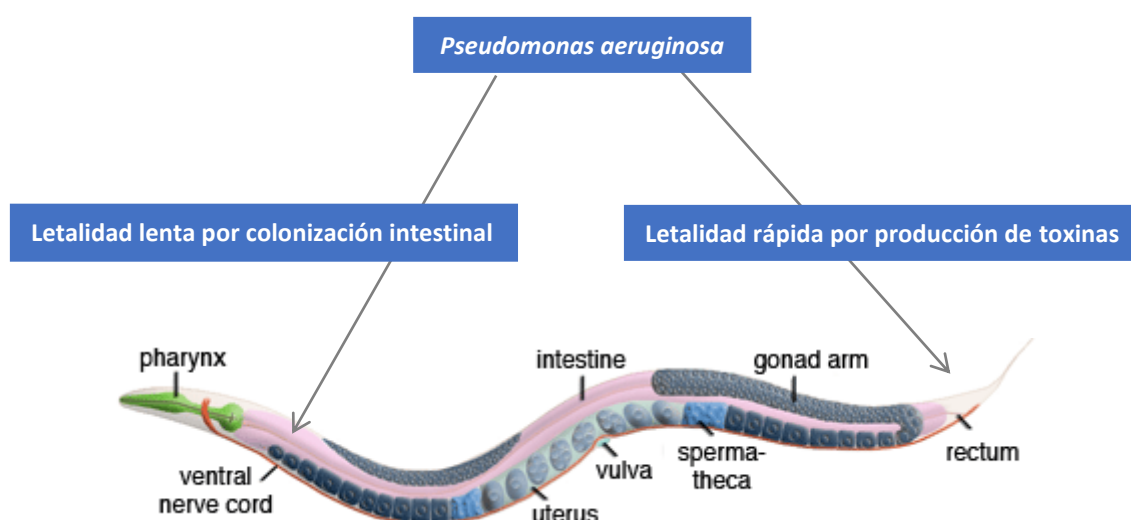


Figura 10. Mecanismos de letalidad en *C. elegans* por *P. aeruginosa*. Adaptada de www.wormatlas.org.

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Como se ha señalado, el aumento observado en los últimos años en la incidencia de infecciones nosocomiales por *P. aeruginosa* MDR/XDR en nuestro centro se había asociado principalmente a la diseminación del clon de alto riesgo ST175 en una situación de endemia persistente. Sin embargo, en los últimos cinco años se ha observado un cambio en la epidemiología de las cepas MDR/XDR pudiendo sugerir la emergencia de nuevos clones epidémicos. Además, la impresión fue que algunas de estas cepas MDR/XDR presentaban un comportamiento más virulento con una presentación clínica más adversa y mayor mortalidad, pudiendo esto no sólo depender en exclusiva del fenotipo de resistencia sino también de otros determinantes del patógeno. Comprender el papel de la multirresistencia, y en particular de los clones de alto riesgo, en la patogénesis de las infecciones invasivas por *P. aeruginosa* tiene implicaciones importantes para controlar la diseminación de la resistencia y diseñar nuevas estrategias de tratamiento.

En este marco surge el presente proyecto de investigación, llevado a cabo durante el periodo 2016-2019, como continuación a la experiencia previa en la que se desarrolló la tesis doctoral “Caracterización molecular y epidemiológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente” por la Dra. Ester Viedma. Para conocer mejor la realidad actual de la bacteriemia por *P. aeruginosa* en nuestro centro, se planteó este trabajo desde una doble aproximación: una clínica, a través de dos estudios retrospectivos observacionales y una experimental, a través de un estudio *in vitro* e *in vivo* como soporte a la investigación clínica.

Proporcionar respuestas a este problema clínico resulta de gran relevancia y requiere de la participación de un equipo con amplia experiencia en la epidemiología molecular y patogenia bacteriana. En este sentido, los grupos de investigación “Epidemiología Molecular de Infecciones Hospitalarias y Emergentes” del Hospital Universitario 12 de Octubre y “Resistencia antibiótica y Patogenia de las Infecciones Bacterianas” del Hospital Universitario Son Espases mantienen una actividad en investigación clínica y experimental en diagnóstico, patogenia y tratamiento en bacteriología humana, incluyendo patógenos multirresistentes, a través de una plataforma para la realización de estudios clínicos y una infraestructura de laboratorio que permite abordar aspectos microbiológicos complejos con técnicas avanzadas de biología molecular.

Este proyecto pretende fundamentalmente tener un impacto directo en la salud individual del paciente. Esto es particularmente importante ya que nos permitirá determinar los factores clínicos y microbiológicos que influyen en el pronóstico de los pacientes con bacteriemia por *P. aeruginosa*, así se podrá influir en ellos a través de su reconocimiento mediante métodos de diagnóstico rápido, y también, orientar las estrategias de manejo clínico y guiar las políticas de tratamiento, incluyendo las nuevas combinaciones de β -lactámico-inhibidor de β -lactamasas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El presente trabajo plantea la hipótesis fundamental de que algunos factores relacionados con el patógeno (fenotipo de resistencia, genotipo de virulencia del SST3 y serotipo del antígeno O), y su interacción, pueden tener influencia en el pronóstico de los pacientes con bacteriemia por *P. aeruginosa*. Por tanto, el discernimiento de estos factores podría ser útil en el conocimiento patogénico de las cepas, y permitiría identificar qué pacientes son especialmente susceptibles de desarrollar infecciones graves o complicaciones que deriven en un mal pronóstico, de cara a orientar estrategias de manejo clínico y guiar políticas de tratamiento antibiótico.

Para probar esta hipótesis, se propusieron los siguientes objetivos:

1. Describir las características clínico-epidemiológicas de los episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa* durante un periodo de 5 años (2013-2017).
2. Describir las características microbiológicas de las cepas de *P. aeruginosa* productoras de bacteriemia.
3. Investigar la asociación entre la multirresistencia y la virulencia de *P. aeruginosa* y su impacto en el pronóstico de los pacientes con bacteriemia.
4. Determinar los factores pronósticos de mortalidad global precoz y tardía asociados a la bacteriemia por *P. aeruginosa*.
5. Caracterizar la virulencia de cepas invasivas de *P. aeruginosa* en función de su fenotipo de resistencia y genotipo de virulencia en un modelo experimental *in vitro* e *in vivo*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Investigación clínica

1.1. Ámbito de estudio

La presente investigación clínica se realizó en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, un hospital de tercer nivel dependiente de la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. El hospital cuenta con tres grandes edificios: la Residencia General, el Centro Materno-Infantil y el Centro de Actividades Ambulatorias. En el recinto hospitalario se ubican también un Edificio Técnico de Instalaciones, un Centro de Investigación y un Pabellón Docente. Además, cuenta con tres Centros de Especialidades Periféricos en su zona de influencia, situados en los distritos de Villaverde, Orcasitas y Carabanchel. Es el centro especializado de referencia para el área sur de Madrid, y también lo es para otros distritos madrileños y otras comunidades autónomas. El hospital está dotado de 1.256 camas de hospitalización. Atiende a una población de 600.000 habitantes, con un total de 255.507 visitas a urgencias, 44.739 ingresos y 31.495 intervenciones quirúrgicas anuales (datos de 2017). Se trata de un hospital de referencia en TOS y TCMH.

Desde 1996, el servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre centra parte de su actividad asistencial e investigadora en la epidemiología, diagnóstico y patogenia de microorganismos resistentes (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, etc.). Esta tarea se desempeña en calidad de servicio central y en estrecha colaboración con el resto de servicios implicados (Enfermedades Infecciosas, Medicina Interna, UCI, Pediatría, Medicina Preventiva, etc.), a través de reuniones conjuntas diarias. En estas sesiones los microbiólogos proporcionan los resultados de los hemocultivos e informan los microorganismos más relevantes desde el punto de vista del control de la infección nosocomial. Estas sesiones de trabajo favorecen la relación entre los diferentes especialistas implicados en la infección nosocomial, garantizando un abordaje multidisciplinar de los pacientes. Cabe destacar que miembros del servicio de Microbiología participan activamente en diferentes proyectos de investigación centrados en la multirresistencia tanto en el ámbito institucional como nacional.

1.2. Diseño de los estudios

Esta tesis doctoral se inició con la realización de un primer estudio clínico piloto de carácter retrospectivo. Los resultados de este trabajo junto con la experiencia previa de nuestro centro hicieron plantearnos una serie de dudas científicas que se intentaron responder mediante un segundo estudio clínico observacional retrospectivo y mediante los estudios experimentales *in vitro* e *in vivo* que se incluyen en este trabajo. Por lo tanto, la investigación clínica de esta tesis doctoral comprende dos estudios observacionales retrospectivos (**Figura 11**).

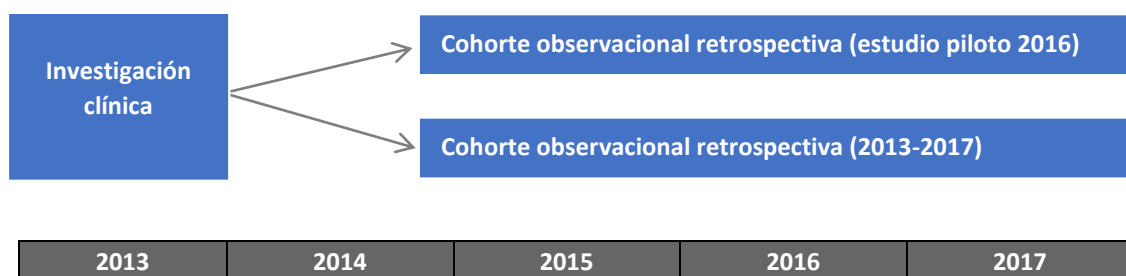


Figura 11. Diseño y periodo de la investigación clínica.

1.2.1. Diseño del primer estudio retrospectivo piloto (2016)

En el primer trabajo (**Anexo 1**), se analizaron de forma retrospectiva todos los episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa* de pacientes adultos (≥ 18 años de edad) diagnosticados en nuestro hospital durante el año 2016. Se incluyó únicamente el primer episodio de bacteriemia de cada paciente (aislamiento no duplicado de *P. aeruginosa* en los hemocultivos). Los objetivos del estudio fueron analizar los factores pronósticos y evaluar el impacto de la multirresistencia y la virulencia (SST3) en la mortalidad de los pacientes con bacteriemia por *P. aeruginosa*.

1.2.2. Diseño del segundo estudio retrospectivo (2013-2017)

En cuanto al segundo trabajo (**Anexo 1**), se analizaron de forma retrospectiva todos los episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa* de pacientes adultos (≥ 18 años de edad) diagnosticados en nuestro centro desde el 1 de enero de 2013 al 31 de diciembre de 2017. Se incluyó únicamente el primer episodio de bacteriemia de cada paciente (aislamiento no duplicado de *P. aeruginosa* en los hemocultivos). Las características del diseño de este segundo estudio, nos permitieron: 1) ampliar el tamaño muestral para confirmar los resultados encontrados en el estudio previo, 2) describir la población con bacteriemia por *P. aeruginosa* en un periodo de cinco años, 3) evaluar los posibles factores pronósticos asociados a la bacteriemia por *P. aeruginosa*, 4) analizar el impacto de la multirresistencia en la evolución clínica de los pacientes, y 5) determinar el posible valor de la multirresistencia y la virulencia (SST3 y serotipo O) como predictores de mortalidad en la bacteriemia por *P. aeruginosa*.

En ambos estudios clínicos, se excluyeron: 1) aquellos pacientes que presentaron una infección polimicrobiana, definida como el aislamiento de un microorganismo diferente, asociado al aislamiento de *P. aeruginosa* en los hemocultivos; y 2) aquellos pacientes que, aun teniendo un hemocultivo positivo para *P. aeruginosa* tuvieran una historia clínica incompleta que no permitiese el análisis posterior, incluidos los pacientes derivados a otros hospitales o en aquellos casos en los que la presencia de *P. aeruginosa* en el hemocultivo fue considerada por el clínico responsable como una pseudobacteriemia y no se hubiese establecido tratamiento.

1.3. Variables de los estudios

Para la obtención de las variables se realizó una revisión sistemática en cada caso de la historia clínica electrónica. Para la recogida de las variables y con arreglo al conjunto de definiciones que se detallarán en el siguiente apartado, se diseñó una base de datos digitalizada, protegida y debidamente anonimizada con el programa Microsoft® Access para Windows (**Anexo 2**). Las variables se agruparon en dos categorías: 1) epidemiológicas y 2) clínicas.

1.3.1. Variables epidemiológicas

Se recogieron las siguientes variables epidemiológicas: 1) **filiación del paciente**, incluyendo el sexo, la fecha de nacimiento, la fecha de ingreso hospitalario y el servicio hospitalario donde los hemocultivos fueron obtenidos; 2) **antecedentes de contacto con el sistema sanitario**, incluyendo la estancia en centro sociosanitario (residencia u hospital de larga estancia), ingreso hospitalario en los últimos 90 días previos al episodio de bacteriemia, ingreso en UCI al menos 48 horas en los 90 días previos al episodio de bacteriemia, procedimientos invasivos (cirugía mayor, catéter urinario, catéter venoso y ventilación mecánica) en los 30 días previos al episodio de bacteriemia; 3) **comorbilidades e inmunodepresión**, incluyendo la presencia de diabetes mellitus, neoplasia sólida o hematológica, el índice de Charlson (144) como medida normalizada de comorbilidad, terapia inmunosupresora previa (incluida quimioterapia, corticoides y otros inmunosupresores), TOS o TCMH, y neutropenia; 4) **colonización** por *P. aeruginosa* MDR/XDR en los 30 días previos al episodio de bacteriemia; y 5) **tratamiento antibiótico** recibido en los 30 días previos al episodio de bacteriemia (β -lactámicos, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, etc.).

1.3.2. Variables clínicas

Se recogieron las siguientes variables clínicas: 1) **episodio de bacteriemia**, incluyendo el ámbito donde se desarrolla (comunitaria, asociada al cuidado sanitario o nosocomial), el foco de origen más probable, índice de bacteriemia de Pitt, presentación en forma de shock séptico (112); 2) **datos microbiológicos**, incluyendo la fecha y hora de la extracción y de la positividad del hemocultivo, presencia de bacteriemia polimicrobiana, sensibilidad antibiótica y perfil de resistencia; 3) **tratamiento recibido**, incluyendo tratamiento antibiótico empírico y/o dirigido, tratamiento adecuado o inadecuado, antibióticos administrados desde el inicio de los síntomas y signos de bacteriemia hasta curación clínica o alta hospitalaria, tratamiento adicional para control del foco (drenaje, desbridamiento, retirada de catéter, etc.), y duración del tratamiento antibiótico; y 4) **pronóstico de la bacteriemia**, incluyendo la mortalidad global temprana (mortalidad a 5 días) y tardía (mortalidad a 30 días), y la fecha del alta hospitalaria.

1.4. Definiciones empleadas

Para la presente investigación se consideraron las siguientes definiciones:

- **Bacteriemia por *P. aeruginosa*:** aislamiento de *P. aeruginosa* en al menos un set (botella aerobia, anaerobia, o ambas) de hemocultivos.
- **Adquisición de la bacteriemia:** la adquisición de la bacteriemia se consideró: 1) **de origen comunitario**, aquella que se produce fuera del hospital o en las primeras 48 horas de ingreso y que no cumple criterios de bacteriemia asociada al cuidado sanitario ni nosocomial; 2) **asociada al cuidado sanitario**, aquella que se produce fuera del hospital o en las primeras 48 horas de ingreso, y que cumple los criterios de Friedman *et al.* (211) (**Tabla 5**); y 3) **nosocomial**, aquella que se produce pasadas las primeras 48 horas de su estancia en el hospital o con antecedente de hospitalización reciente.

Tabla 5. Criterios de Friedman *et al.* (211).

Criterios de bacteriemia asociada al cuidado sanitario
1. Antecedente de recibir terapia intravenosa, cura de herida o cura especializada en domicilio o centro sanitario en los 30 días previos al episodio de bacteriemia.
2. Antecedente de acudir a hemodiálisis en hospital o centro especializado o recibir quimioterapia intravenosa ambulatorio en los 30 días previos al episodio de bacteriemia.
3. Antecedente de haber estado hospitalizado más de 48 horas en un hospital de agudos en los 90 días previos al episodio de bacteriemia.
4. Antecedente de residir en residencia de ancianos o centro hospitalario de larga estancia.

- **Origen o foco de la bacteriemia:** el foco de la bacteriemia se definió por criterios clínicos y microbiológicos, este último determinado por el aislamiento en una localización clínicamente significativa de la cepa causante de la bacteriemia. La bacteriemia se consideró primaria o de origen desconocido en aquellos pacientes en los que no se identificó el origen de la misma. Se establecieron dos grupos en función del origen de la bacteriemia: 1) **foco de bajo riesgo**, que incluyó el foco urinario y el de catéter vascular; y 2) **foco de alto riesgo**, que incluyó el foco desconocido, respiratorio, abdominal y piel y partes blandas (139).
- **Neutropenia severa:** aquella con cifras menores de 500 células/mm³.
- **Índice de Charlson:** sistema de puntuación que permite predecir la mortalidad a un año en base a la comorbilidad subyacente que presenta un paciente (144). En la **Tabla 6** se resumen las patologías que se tienen en cuenta, cuyo valor numérico está relacionado con el riesgo relativo de muerte en el primer año. Según la puntuación final se clasifica como ausencia de comorbilidad (0 puntos), comorbilidad baja (1 punto), media (2 puntos) o alta (≥ 3 puntos).

Tabla 6. Índice de comorbilidad de Charlson (144).

Patología subyacente	Puntuación
Infarto agudo de miocardio	1
Insuficiencia cardíaca congestiva	1
Enfermedad vascular periférica	1
Accidente cerebrovascular	1
Demencia	1
Enfermedad pulmonar crónica	1
Enfermedad del tejido conectivo	1
Diabetes mellitus	1
Enfermedad péptica	1
Hemiplejia	2
Insuficiencia renal moderada o severa	2
Hepatopatía leve (sin hipertensión portal, incluye hepatopatía crónica)	2
Diabetes mellitus con lesión de órgano diana	2
Neoplasia sólida sin metástasis o hematológica	2
Hepatopatía moderada o severa	3
Neoplasia sólida con metástasis	6
SIDA	6

Ausencia de comorbilidad (0 puntos); comorbilidad baja (1 punto); media (2 puntos) o alta (≥ 3 puntos).

- **Inmunodepresión:** incluye la presencia de diabetes mellitus, neoplasias sólidas en tratamiento con quimioterapia, neoplasias hematológicas (leucemia, linfoma y neoplasias de células plasmáticas), TOS, TCMH, neutropenia (cifra de neutrófilos <1000 células/mm³) y terapia con inmunosupresores (quimioterapia, glucocorticoides a dosis mayor de 20 mg/día más de 7 días o equivalente o corticoterapia de larga evolución, u otros inmunosupresores).
- **Colonización por *P. aeruginosa*:** aislamiento de *P. aeruginosa* en una muestra biológica anatómicamente no estéril sin que existan datos clínicos de infección activa.
- **Tiempo hasta positividad (TP) del hemocultivo:** se definió como el tiempo (en horas) que transcurre entre el inicio de la incubación del hemocultivo en el equipo y la señal de alerta automatizada. El TP fue recogido automáticamente por el software del sistema. Cuando *P. aeruginosa* creció en múltiples hemocultivos, se registró el TP más corto.
- **Índice de bacteriemia de Pitt:** sistema de puntuación utilizado para medir la gravedad del episodio de bacteriemia en función de la temperatura, la tensión arterial, la necesidad de intubación, el estado mental y la presencia de parada cardiorrespiratoria (**Tabla 7**) (149). Se eligió frente al APACHE II por ser más fácil de calcular y tener mayor sensibilidad y especificidad para predecir mortalidad (212).

Tabla 7. Índice de bacteriemia de Pitt (149).

Parámetro	Puntuación
Temperatura (T ^a)	
36.1°C-38.9°C	0
35.1°C-36°C o 39°C-39.9°C	1
≤35°C o ≥40°C	2
Tensión arterial	
Tensión arterial sistólica <90 mmHg	2
Descenso de tensión arterial sistólica > 30 mmHg o diastólica > 20 mmHg	2
Necesidad de soporte vasoactivo	2
Ventilación mecánica	2
Parada cardiorrespiratoria	4
Estado mental	
Alerta	0
Desorientado	1
Estuporoso	2
Comatoso	4

No grave (0-1 puntos); grave (2-4 puntos) o muy grave (≥5 puntos). °C: grados; mmHg: milímetros de mercurio.

- **Sepsis:** disfunción orgánica causada por una alteración en la respuesta del huésped a la infección, estando ésta asociada a una alta mortalidad (**Tabla 8**) (112).
- **Shock séptico:** sepsis asociada a hipotensión arterial que persiste pese a la administración intensiva de fluidos e hiperlactacidemia, junto con disfunción orgánica por hipoperfusión, requiriendo de soporte vasoactivo (**Tabla 8**) (112).

Tabla 8. Definiciones de sepsis y shock séptico.

Término	Definición	Comentarios
Sepsis	Respuesta desregulada + disfunción orgánica (SOFA y qSOFA)	Mortalidad >10%
	qSOFA:	
	Frecuencia respiratoria ≥22 rpm	
	Tensión arterial sistólica ≤100 mmHg	
	Alteración del estado mental	
Shock séptico	Sepsis +:	Mortalidad >40%
	Hipotensión refractaria a fluidoterapia	
	Necesidad de soporte vasoactivo (PAM ≥65 mmHg)	
	Lactato > 2	

SOFA: *sequential organ failure assessment*; qSOFA: *quick sequential organ failure assessment*; rpm: respiraciones por minuto; mmHg: milímetros de mercurio; PAM: presión arterial media. Tomado de Singer *et al.* (112).

- **Clasificación del fenotipo de resistencia de *P. aeruginosa*:** los diferentes fenotipos de *P. aeruginosa* se estratificaron según su patrón de resistencia antibiótica siguiendo los criterios de Magiorakos *et al.* (161), en función de los grupos de antibióticos detallados previamente (Tabla 4). Se consideró: 1) ***P. aeruginosa* multirresistente (MDR)**, aquella cepa resistente a uno o más antibióticos en tres o más categorías de antibióticos antipseudomónicos; 2) ***P. aeruginosa* extremadamente resistente (XDR)**, aquella cepa resistente a al menos un antibiótico de todas las categorías de antibióticos antipseudomónicos excepto en dos o menos, incluyéndose dentro de la categoría MDR; y 3) ***P. aeruginosa* no multirresistente**, incluye tanto las cepas salvajes o sensibles a todos los antipseudomónicos (multisensible, MultiS) como las cepas con resistencia a uno o más antibióticos en una o dos categorías de antipseudomónicos (moderadamente resistente, ModR) (20).
- **Cepa resistente:** hace referencia a una cepa con sensibilidad intermedia o resistente.
- **Cepas con fenotipo similar:** hace referencia a 2 aislamientos recuperados de distintas muestras con un patrón de sensibilidad a los antibióticos testados superponible.
- **Virulencia:** se definió como la capacidad de *P. aeruginosa* de provocar enfermedad en el huésped valorando el daño producido. En la investigación clínica, la virulencia fue medida por la capacidad de producir infección severa y mortalidad. En la investigación experimental, la virulencia vino determinada por la capacidad de producir letalidad en el modelo *in vivo* y por la capacidad de producir citotoxicidad en el modelo *in vitro*.
- **Tratamiento antibiótico empírico:** se definió como el antibiótico administrado en las primeras 24 horas de la infección y antes de conocer la sensibilidad de la cepa.
- **Tratamiento antibiótico dirigido:** se definió como el antibiótico administrado una vez conocido el resultado del antibiograma.
- **Tratamiento antibiótico adecuado:** se consideró el tratamiento antibiótico adecuado cuando al menos uno de los antibióticos administrados tenía actividad *in vitro* frente a la cepa aislada. En bacteriemias secundarias a foco respiratorio, la monoterapia con aminoglucósidos o colistina inhalada, se consideró inadecuada (213).
- **Mortalidad precoz:** aquella que se produjo en los primeros 5 días tras el inicio del episodio de bacteriemia.
- **Mortalidad tardía:** aquella que se produjo en los 30 días siguientes al inicio del episodio de bacteriemia.
- **Mortalidad global:** aquella que se produjo por cualquier causa.
- **Mortalidad atribuible:** aquella que se produjo como causa directa de la bacteriemia y sus complicaciones, y una vez excluida otras causas.

1.5. Estudios microbiológicos y moleculares

1.5.1. Procesamiento de los hemocultivos

Las muestras de sangre fueron inoculadas en botellas de hemocultivos aerobia (BacT/ALERT FA) y anaerobia (BacT/ALERT FN) e incubadas en el sistema BacT/ALERT 3D® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) durante 5 días. Tras la positividad del hemocultivo, se realizó tinción de Gram y ante la presencia de bacilos Gram-negativos, se realizó subcultivo en medios convencionales (agar sangre, agar chocolate y medio específico de anaerobios) y diferenciales (agar McConkey), así como la realización de un antibiograma preliminar directo del hemocultivo por el método de E-test en placa de agar Müller-Hinton con tiras de gradiente de CMI de ceftriaxona y meropenem (bioMérieux).

1.5.2. Identificación de las cepas bacterianas

La identificación inicial de las cepas de *P. aeruginosa* se efectuó según métodos convencionales que incluyeron la morfología de la colonia, la reacción de oxidasa, y pruebas bioquímicas. Posteriormente, se confirmó la identificación de los aislados mediante espectrometría de masas utilizando el sistema MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Este sistema recibe su nombre por las siglas *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*. Es un sistema basado en la espectrometría de masas propuesto por Karas *et al.* (214) que utiliza energía láser para ionizar una muestra clínica o un aislado. Estos iones sometidos a un campo eléctrico, viajan en un tubo de vacío a distinta velocidad según su masa y su carga. Al llegar al detector se genera una serie de picos en base al número de iones detectados, su masa y su carga, generando un espectro específico de cada especie bacteriana equivalente a su huella digital (**Figura 12**).



Figura 12. Esquema de funcionamiento del MALDI-TOF.

Estos picos corresponden a proteínas o moléculas biológicas y su presencia se atribuye a diferencias en la expresión génica a nivel de género o especie. La huella digital generada o espectro se compara con una base de datos preexistente de otros espectros para determinar, según el grado de similitud, a qué género o especie corresponde el aislado analizado.

Para la identificación, se tomó una porción de la colonia de un cultivo puro de cada cepa y se depositó en los distintos pocillos de la tarjeta de identificación. Una vez secos se añadieron 0.7 µL de matriz HCCA (ácido α -ciano-3,4-hidrocinámico) (Bruker Daltonics) a cada pocillo y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente se introdujeron en el instrumento para su identificación. Se consideró la identificación de *P. aeruginosa* como válida si el software (Maldi Biotyper, versión 3.1, Bruker Daltonics) proporcionó un índice o *score* igual o superior a 2.3, según las instrucciones del fabricante.

1.5.3. Conservación de las cepas bacterianas

Las cepas de *P. aeruginosa* confirmadas se conservaron mediante congelación a -80°C utilizando criotubos de perlas CryoBank™ (Copan Diagnostics Inc., Corona, CA, EEUU). Para los estudios microbiológicos que se detallan a continuación, las cepas bacterianas conservadas se obtuvieron a partir de cultivos realizados en placas de agar sangre incubadas durante 24h a 37°C.

1.5.4. Estudios de sensibilidad antibiótica

El estudio de la sensibilidad antibiótica se llevó a cabo mediante técnica de microdilución con el sistema semiautomatizado MicroScan Walkaway (Beckman Coulter Diagnostics, Indianapolis, EEUU). Este sistema utiliza paneles con sustratos para la identificación bioquímica de los microorganismos y con concentraciones de antimicrobianos en base dos para la CMI (**Tabla 9**).

Tabla 9. Antibióticos analizados y puntos de corte de sensibilidad utilizados (EUCAST v.8.1.).

Antibiótico	Abreviatura utilizada	Rango CMI (mg/L)	Puntos de corte (mg/L)	
			S ≤	R >
Ceftazidima	CAZ	1-32	8	8
Cefepime	FEP	1-16	8	8
Aztreonam	ATM	1-16	1	16
Piperacilina-tazobactam	PIP/TZ	8-64/4	16	16
Imipenem	IMP	1-8	4	8
Meropenem	MER	1-8	2	8
Gentamicina	GEN	1-8	4	4
Tobramicina	TOB	2-8	4	4
Amikacina	AMI	8-32	8	16
Ciprofloxacino	CIP	0.5-2	0.5	0.5
Colistina	COL	2-4	2	2
Ceftolozano-tazobactam ^a	TOL/TZ	0.016-256/4	4	4
Ceftazidima-avibactam ^a	CAZ/AVI	0.016-256/4	8	8

^aDeterminados por E-test. S: sensible; I: intermedio; R: resistente.

Los resultados fueron interpretados según las normas de EUCAST (*European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing*) versión 8.1. (www.eucast.org) (215), considerándose también como resistentes los aislados con punto de corte intermedio. Dado que para la fosfomicina no existen puntos de corte clínicos definidos por EUCAST, dificultando así la clasificación fenotípica de las cepas, no se incluyó este antibiótico en la presente investigación. Adicionalmente, se determinó la CMI de las nuevas combinaciones de antibióticos ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam mediante técnica de difusión por el método de E-test (bioMérieux). Para ello se prepararon inóculos con una turbidez similar a un 0.5 de la escala de McFarland ($\approx 10^8$ UFC/mL) de las cepas y se sembraron en placas de agar Müller-Hinton realizando un tapiz o césped bacteriano, en los que se colocaron las tiras de gradiente de CMI (bioMérieux) de ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam.

1.5.5. Caracterización de la producción de carbapenemasas

Se identificó a los aislados de *P. aeruginosa* susceptibles de ser productores de carbapenemasa mediante la lectura interpretada del antibiograma preliminar (resistencia a meropenem) y del antibiograma definitivo (resistencia a todos los betalactámicos incluidos carbapenémicos). Se confirmó la caracterización de carbapenemasas mediante métodos fenotípicos y genotípicos:

- **Detección fenotípica de la presencia de MBL:** el *screening* fenotípico para la producción de MBL se realizó mediante el método E-test MBL (AB Biodisk, Solna, Suecia) con una combinación de imipenem e imipenem-EDTA. Las tiras de E-test contienen en uno de sus extremos imipenem y en el otro imipenem más EDTA (IP/IPI, 4-256/1-64 μ g). Los resultados se interpretaron como positivos o negativos según las instrucciones del fabricante. Así, una disminución de tres o más diluciones en la CMI del imipenem en presencia de EDTA fue sugestiva de la producción de MBL. La presencia de una zona “fantasma” entre los dos diferentes gradientes o la deformación de las elipses también fue indicativa de MBL.
- **Amplificación de genes mediante técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** la caracterización de los genes codificadores de carbapenemasas se llevó a cabo mediante PCR y posterior secuenciación. Los *primers* (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU) y las condiciones utilizadas para la detección de estos genes se detallan en la **Tabla 10**. Para la extracción de ADN genómico se sembraron las cepas en placas de agar sangre y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Del cultivo crecido se resuspendió una colonia en 200 μ L de buffer TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) y se procedió a la extracción automatizada del ADN siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, Redwood City, California, EEUU). Posteriormente se retiró el eluido con el ADN solubilizado que se archivó a 4°C hasta su uso.

Tabla 10. *Primers y condiciones empleadas para la caracterización de carbapenemasas.*

Secuencia 5´-3´	Tamaño (Pb)	Condiciones	Referencia
<i>bla</i> _{KPC}	761	1 ciclo de 12 min a 94°C 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C y 45 seg a 72°C 1 ciclo de 10 min a 72°C	(216)
F: TCGCTAAACTCGAACAGG			
R: TTAAGTCCCGTTGACGCCCAATCC			
<i>bla</i> _{GES}	519		
F: CGCTAGCCGCGCTGGTCTTT			
R: CCAATGTCGTTCCGGCCCCC			
<i>bla</i> _{VIM-1}	799	1 ciclo de 12 min a 94°C 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 56°C y 45 seg a 72°C 1 ciclo de 10 min a 72°C	
F: GTTAAAAGTTATTAGTAGTTTATTG			
R: CTAAGCGGCGACTGAGC			
<i>bla</i> _{VIM-2}	801		
F: ATGTTCAAACCTTTGAGTAAG			
R: CTAAGCAACGACTGAGCG			
<i>bla</i> _{IMP-1}	741		
F: ATGAGCAAGTTATCTGTATTC			
R: TTAGTTGCTTGGTTTTGATGG			
<i>bla</i> _{IMP-2}	741		
F: ATGAAGAAATTATTTGTTTTATG			
R: TTAGTTACTTGGCTGTGATG			

F: *forward*; R: *reverse*; Pb: pares de bases; min: minutos; seg: segundos; °C: grados centígrados.

Se utilizó la técnica de PCR para la detección mediante amplificación de diversos genes de carbapenemasas más comunes (*bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{IMP-1} y *bla*_{IMP-2}) (73,79). La polimerasa utilizada fue la AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Norwalk, Connecticut, EEUU), una polimerasa de alta fidelidad y especificidad. Todas las reacciones se llevaron a cabo con un volumen total de 50 µL en un termociclador LabCycler (SensQuest®). Los reactivos utilizados para esta PCR se detallan a continuación:

Master mix AmpliTaq Gold ADN polimerasa (Applied Biosystems)	
Reactivos	Volumen (µL)
Buffer II (10X)	5
MgCl ₂ (25 mM)	3
dNTPs (10 mM)	1
Taq polimerasa (5 unidades/µL)	0.5
Primer forward 100 µM	0.5
Primer reverse 100 µM	0.5
Agua grado PCR	38.5
ADN muestra	1
Volumen total de reacción= 50 µL	

La determinación del tamaño de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis de corriente continua en geles de agarosa D1 *Low EEO* (Pronadisa) al 1-2%, dependiendo del tamaño del fragmento a separar, en TBE 0.5X (Tris-Borato-EDTA: 44.5 mM Tris base, 44.5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8), utilizando el marcador de peso molecular ϕ X174 DNA Digest (Takara Bio Inc., Kasatsu, Shiga, Japón) a 90-100 V. El *buffer* de carga utilizado fue 10X *Loading Buffer* (Takara Bion Inc.). Los geles se tiñeron con 1 μ L de GelRed™ *Nucleic Acid Gel Stain* 10.000X (Biotinum Inc., Fremont, California, EEUU), un agente intercalante del ADN que permite visualizar las moléculas de ácidos nucleicos bajo luz ultravioleta. Los amplicones de aquellos genes que requirieron secuenciación fueron sometidos a purificación usando ExoSAP-IT® *purification kit* (USB Corp, Cleveland, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificados los amplicones, se llevó a cabo una PCR de secuenciación para cada cadena de ADN con BigDye® *Terminator* versión 3.1 *Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems). La secuenciación se realizó con el secuenciador ABI PRISM 3700 ADN *analyzer* (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Geneious 5.4.4 (Biomatters, Ltd.) comparando las diferentes secuencias con la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

1.5.6. Análisis de la estructura poblacional

El análisis de la estructura poblacional de las cepas seleccionadas se llevó a cabo mediante:

- **Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE):** esta metodología se utiliza para reconocer la relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente y, por tanto, derivados recientes de un ancestro común. Esta técnica consiste en la combinación de una macrorrestricción de ADN cromosómico junto con una electroforesis. En la presente investigación, se analizó la relación clonal de los aislados seleccionados mediante PFGE tras la digestión con la enzima de restricción *SpeI* (bioLabs, Inglaterra), siguiendo una versión modificada del protocolo de Kaufmann *et al.* (217), como se detalla a continuación.
- Partiendo de un cultivo de *P. aeruginosa* incubado durante 24 horas a 37°C, se seleccionó una colonia de cada aislado y se inocularon en 5 mL de medio LB (Luria Bertani, Difco BD) líquido incubándose en agitación a 180 rpm durante 18 horas a 37°C. Se recogió 1 mL del cultivo y se centrifugó a 8000 rpm durante 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el sedimento o pellet con 500 μ L de solución PIV (Tris HCl 1M, NaCl 5M, pH 8). Para ajustar la suspensión bacteriana se midió la densidad óptica (DO_{600}) siguiendo la fórmula: $(D.O \times 40 \times 210) - 210 = \text{vol. de PIV}$. La D.O debe estar entre 1.8-2.

- Para la elaboración de los bloques o *plugs* de agarosa, se mezclaron 200 μ L de la suspensión ajustada con 200 μ L de agarosa *Standard Low* (BioRad) al 1.6% previamente atemperada a 42°C. Se distribuyó la mezcla en moldes y se dejó solidificar. Posteriormente, se sumergió cada uno de los *plugs* obtenidos en 1 mL de solución de lisis compuesta por 985 μ L de EC (Tris-HCl 1 M, NaCl 5 M, EDTA 0.5 M, desoxicolato sódico al 10%, lauroil sarcosinato al 1% pH 8), 10 μ L de RNasa (20 μ g/mL) y 5 μ L de lisozima (100 μ g/mL) durante 5 horas. Después, se sustituyó esta solución por otra compuesta por 1000 μ L de ES (EDTA 0.5 M, lauroil sarcosinato al 1%, pH 8) y 10 μ L de proteinasa K (20 mg/mL) durante 18 horas a 50°C.
- Al día siguiente se lavaron los *plugs*, 4 lavados con 5 mL de TE 1X (Tris-HCl 1M, EDTA 0.5 M, pH 8) durante 30 minutos en agitación. Los bloques resultantes se conservaron en 2 mL de TE 1X a 4°C hasta su digestión.
- Para la realización de la electroforesis se cortó un tercio de cada *plug*, se introdujeron en un tubo eppendorf y se dispensó 100 μ L de solución de digestión preparada con 2 μ L de la enzima de restricción *SpeI* (BioLabs), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los tubos con los fragmentos de los *plugs* en digestión se incubaron a 37°C durante 4 horas. Pasado el tiempo de digestión, se cargaron los fragmentos de los *plugs* en un gel de agarosa *Pulse Field Certified Agarose* (BioRad) al 1% en TBE 0.5X junto con el marcador molecular λ -ladder PFGE (bioLabs). La separación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo en el sistema CHEF-DRIII (BioRad) con 2 L de buffer TBE 0.5X con las siguientes condiciones: 6v/cm² con rampas de 5-45 segundos a 14°C durante 20 horas. Como controles estándar se utilizaron las cepas de *P. aeruginosa* caracterizadas molecularmente en los estudios previos de Viedma *et al.* (73,79).
- Una vez terminado el tiempo de electroforesis, se sumergió el gel en agua con colorante GelRed™ (90 μ L de colorante en 300 mL de agua destilada) durante 10-30 minutos y se visualizó con luz ultravioleta. La interpretación de los resultados se estableció por comparación visual de los patrones obtenidos aplicando los criterios definidos por Tenover *et al.* (218). La migración de los fragmentos de ADN fue normalizada con un marcador de tamaño apropiado y el análisis del patrón del PFGE fue llevado a cabo usando el software Bionumerics versión 3.0 (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Bélgica).
- **Multilocus Sequence Typing (MLST):** esta metodología consiste en el análisis mediante PCR y secuenciación del ADN de fragmentos internos de aproximadamente 450-500 pares de bases de siete genes conservados (*housekeeping*). La comparación de estas secuencias entre distintos aislamientos permite establecer identidades o diferencias clonales de gran utilidad en el análisis epidemiológico. Para cada gen, las diferentes secuencias presentes dentro de una especie bacteriana se asignan como alelos distintos. La combinación de estos alelos

permite determinar el perfil alélico o ST de cada una de las cepas a estudio. El esquema de MLST de *P. aeruginosa* desarrollado por Curran *et al.* (181) utiliza los siguientes siete genes: *acsA* (acetyl coenzyme A synthetase), *aroE* (shikimate dehydrogenase), *guaA* (GMP synthase), *mutL* (DNA mismatch repair protein), *nuoD* (NADH dehydrogenase I chain C, D), *ppsA* (phosphoenolpyruvate synthase) y *trpE* (anthralite synthetase component I). Los primers (Invitrogen) y las condiciones utilizadas para la detección de estos genes se detallan en la **Tabla 11**. El procedimiento consta de las siguientes fases, detalladas previamente en el apartado 1.5.5: 1) extracción de ADN genómico; 2) amplificación de los genes conservados; 3) purificación de los amplificados con ExoSAP-IT® (USB Corp); 4) reacción de secuenciación; y 5) análisis de las secuencias obtenidas, éstas fueron analizadas mediante la base de datos de MLST de *P. aeruginosa* (<http://www.pubmlst.org/paeruginosa>).

Tabla 11. Primers y condiciones empleadas para el MLST de *P. aeruginosa*.

Secuencia 5´-3´	Tamaño (Pb)	Condiciones	Referencia
<i>acsA</i>	842	1 ciclo de 1 min a 96°C 30 ciclos de 1 min a 96°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C 1 ciclo de 10 min a 72°C	(181)
F: ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC			
R: GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT			
<i>aroE</i>	1053		
F: TGGGGCTATGACTGGAAACC			
R: TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA			
<i>guaA</i>	940		
F: CGGCCTCGACGTGTGGATGA			
R: GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA			
<i>mutL</i>	940		
F: CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG			
R: CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC			
<i>nuoD</i>	1042		
F: ACCGCCACCCGTACTG			
R: TCTCGCCCATCTTGACCA			
<i>ppsA</i>	989		
F: GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG			
R: GGGTTCTCTTCTCCGGCTCGTAG			
<i>trpE</i>	811		
F: GCGGCCAGGGTCGTGAG			
R: CCCGGCGCTTGTGATGGTT			

MLST: multilocus sequence typing; F: forward; R: reverse; Pb: pares de bases; min: minutos; °C: grados centígrados. Los primers y condiciones de secuenciación empleadas para el MLST se detallan en Curran *et al.* (181).

1.5.7. Genotipo del sistema de secreción tipo III

La caracterización de los genes del SST3 (*exoS*, *exoT*, *exoU*, *exoY*) se llevó a cabo mediante PCR y secuenciación como se detalló previamente en el apartado 1.5.5. Se siguió una versión modificada del protocolo descrito por Feltman *et al.* (26). Los *primers* (Invitrogen) y las condiciones utilizadas para la detección de estos genes se detallan en la **Tabla 12**.

Tabla 12. *Primers* y condiciones empleadas para la caracterización del genotipo del SST3.

Secuencia 5'-3'	Tamaño (Pb)	Condiciones	Referencia
<i>exoS</i>	534	1 ciclo de 12 min a 94°C 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 58°C y 30 seg a 72°C 1 ciclo de 10 min a 72°C	(26)
F: TCAGGTACCCGGCATTCACTACGCG			
R: TCACTGGAGGTTCTGTGACGTCTTTC			
<i>exoT</i>	457		
F: TCACTGCAGTTCCGCGTCCTCCGAGC			
R: TCAGGTACCTGCTGGTACTGCCCGT			
<i>exoU</i>	1546		
F: AGCGTTAGTGACGTGCG			
R: GCGCATGGCATCGAGTAACTG			
<i>exoY</i>	378		
F: TCCAAGCTTATGCGTATCGACGGTC			
R: CGTATCGATCCGAGGGGGGTGTAT			

SST3: sistema de secreción tipo 3; F: *forward*; R: *reverse*; Pb: pares de bases; min: minutos; °C: grados centígrados.

1.5.8. Serotipo del antígeno O

El serotipo del antígeno O se llevó a cabo mediante aglutinación con antisueros específicos monovalentes (O1 a O16) (BioRad) (219), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se consideró como no tipable, aquella cepa que no aglutinó con ningún antisuero.

1.6. Análisis estadístico

Las variables cualitativas se expresaron como frecuencias absolutas (n) y porcentajes (%). Las variables cuantitativas se describieron mediante sus medidas de tendencia central (media o mediana) acompañadas de la correspondiente medida de dispersión (desviación estándar [DE] o rango intercuartílico [RIQ], respectivamente), según presentaran o no una distribución asimilable a la normalidad. Ésta fue evaluada mediante el test de Kolmogórov-Smirnov. Las variables categóricas fueron comparadas mediante el test chi-cuadrado (χ^2), excepto en los casos en los que la frecuencia absoluta esperada fuera <5 en más del 20% de las casillas, situación en la que se aplicó el test exacto de Fisher. Las variables cuantitativas continuas fueron

comparadas mediante la prueba de la *t* de Student cuando presentaban una distribución normal, o con la prueba no paramétrica de la *U* de Mann-Whitney en caso de que su distribución no se ajustara a la normalidad. La incidencia se calculó en base a las estancias (ingresos y urgencias totales) hospitalarias registradas en el hospital. Los cambios de incidencia se estudiaron mediante el test de tendencia lineal de Mantel-Haenszel. Las asociaciones entre variables fueron expresadas mediante su razón de ventaja (*odds ratio* [OR]) con los correspondientes intervalos de confianza (IC) del 95%. Se fijó un valor de $P < 0.05$ como nivel de significación estadística. Todos los test de contraste de hipótesis fueron bilaterales. Para el análisis de los diferentes factores de riesgo de mortalidad se llevó a cabo un análisis univariante comparando las características de los pacientes con y sin supervivencia a lo largo del periodo considerado. Las variables que presentaron un valor de $P < 0.1$ en dicho análisis fueron incluidas en un modelo multivariante de regresión logística con proceso de selección por pasos hacia atrás (*backward*), empleando como variable dependiente el desarrollo de mortalidad global precoz (a 5 días) y tardía (a 30 días). El mejor modelo fue seleccionado mediante la razón de verosimilitud (*likelihood ratio*). En los análisis de mortalidad no se incluyó el tratamiento antibiótico dirigido debido a las características observacionales y retrospectivas del estudio. Los pacientes desestimados para tratamiento antibiótico activo (considerando aquellos pacientes paliativos) no se incluyeron en los análisis de mortalidad. Los análisis estadísticos fueron realizados en su mayoría con el paquete estadístico SPSS versión 20.0. (IBM Corp., Armonk, NY, EEUU), mientras que los gráficos fueron generados con el *software* GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad, La Jolla, California, EEUU).

1.7. Aspectos éticos

Toda la información recogida fue tratada de forma estrictamente confidencial, cumpliendo en todo momento las disposiciones de la ley 41/2002 de 14 de noviembre, ley básica reguladora de la autonomía del paciente y de los derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, de la ley orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal, y del real decreto 994/1999, de 11 de junio, por el cual se aprueba el reglamento de las medidas de seguridad de los ficheros automatizados que contemplan datos de carácter personal. El protocolo original del estudio clínico (investigador principal: Fernando Chaves) a partir del cual se ha diseñado la presente investigación fue aprobado por la Comisión de Investigación del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (imas12), no considerando necesaria la solicitud de consentimiento informado por el carácter observacional y retrospectivo de la misma (referencia: TP17/0041), con fecha 3 de febrero de 2017 (**Anexo 3**).

2. Investigación experimental

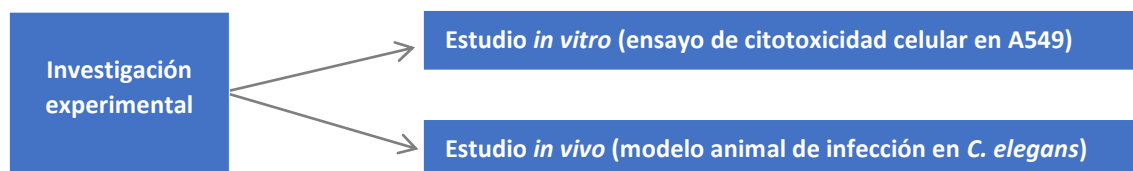
2.1. Ámbito de estudio

La presente investigación experimental se realizó en el laboratorio del grupo de investigación “Epidemiología Molecular de Infecciones Hospitalarias y Emergentes” del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (imas12) del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, y en el laboratorio del grupo de investigación “Resistencia antibiótica y Patogenia de las Infecciones bacterianas” del Instituto de Investigación Sanitaria Islas Baleares (IdISBa) del Hospital Universitario Son Espases de Palma de Mallorca. El doctorando fue el responsable de realizar en su totalidad los estudios experimentales *in vitro* e *in vivo* y el análisis de los datos derivados de éstos. Para ello, realizó una estancia formativa de dos meses de duración en el Hospital Universitario Son Espases para familiarizarse con el modelo de experimentación de invertebrado *C. elegans*, bajo la supervisión del Dr. Antonio Oliver y la Dra. Laura Zamorano.

El grupo de investigación “Epidemiología Molecular de Infecciones Hospitalarias y Emergentes” está liderado por el Dr. Fernando Chaves (Servicio de Microbiología), mientras que el grupo de investigación “Resistencia antibiótica y Patogenia de las infecciones bacterianas” está coordinado por el Dr. Antonio Oliver (Servicio de Microbiología). Ambos grupos de investigación están formados por investigadores postdoctorales y predoctorales del Hospital Universitario 12 de Octubre y del Hospital Universitario Son Espases. Están acreditados como grupos de investigación competitivos de las Comunidades Autónomas de Madrid y de las Islas Baleares. Además, forman parte de la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI) del Instituto de Salud Carlos III. Como líneas de investigación principales de ambos grupos cabe destacar: 1) **Epidemiología molecular de microorganismos multirresistentes**, incluyendo los mecanismos de resistencia, análisis del microbioma, resistoma y viruloma, y la evaluación de nuevos antibióticos en colaboración con la industria farmacéutica; 2) **Infección e inmunidad**, incluyendo las interacciones patógeno-huésped y el papel de los factores de virulencia; y 3) **Infecciones bacterianas crónicas**, incluyendo su patogénesis, los mecanismos de adaptación y persistencia (modelos de crecimiento en *biofilm*), y el desarrollo de estrategias terapéuticas.

2.2. Diseño de los estudios

Esta tesis doctoral comprende dos estudios experimentales (**Anexo 1**) que dan soporte a la investigación clínica: un estudio *in vitro*, que incluye un ensayo de citotoxicidad celular en la línea A549; y un estudio *in vivo*, que incluye un modelo de infección animal en el invertebrado *C. elegans* para el estudio de la virulencia de las cepas de *P. aeruginosa* (**Figura 13**).



2013	2014	2015	2016	2017
------	------	------	------	------

Figura 13. Diseño y periodo de la investigación experimental.

2.2.1. Selección de las cepas bacterianas

Los aislados invasivos estudiados en la presente investigación experimental forman parte de la colección procedente de los estudios clínicos previamente descritos. Se seleccionaron un total de 38 cepas clínicas no duplicadas de *P. aeruginosa* con diferente fenotipo de resistencia y genotipo de virulencia, procedentes de pacientes que habían presentado bacteriemia por *P. aeruginosa* durante el periodo de estudio. Se consideró que las cepas seleccionadas proporcionaban un perfil representativo del fenotipo de resistencia y de los clones de alto riesgo más comunes (ST175 y ST235) en nuestro medio. Las principales características de las cepas incluidas en el estudio se detallan en la **Tabla 13**. Además, se seleccionaron dos cepas de *P. aeruginosa* como cepas de referencia: la cepa PAO1 (*exoU*⁺/*exoS*⁻; referencia de invasividad) y la cepa PA14 (*exoU*⁺/*exoS*⁻; referencia de citotoxicidad).

Tabla 13. Cepas bacterianas incluidas en los estudios experimentales.

Cepa	Observaciones	Perfil de resistencia	Foco de la bacteriemia	Pronóstico
PA16-03	Cepa clínica	XDR	Catéter	No fallecido
PA16-13	Cepa clínica	XDR	Respiratorio	Fallecido
PA16-15	Cepa clínica	XDR	Abdominal	Fallecido
PA16-18	Cepa clínica	XDR	Urinario	No fallecido
PA16-21	Cepa clínica	XDR	Piel y partes blandas	Fallecido
PA16-25	Cepa clínica	MultiS	Urinario	Fallecido
PA16-27	Cepa clínica	ModR	Abdominal	No fallecido
PA16-31	Cepa clínica	ModR	Desconocido	No fallecido
PA16-32	Cepa clínica	MDR	Abdominal	No fallecido
PA16-33	Cepa clínica	MultiS	Desconocido	No fallecido
PA16-34	Cepa clínica	MultiS	Urinario	No fallecido
PA16-35	Cepa clínica	ModR	Abdominal	No fallecido
PA16-37	Cepa clínica	ModR	Piel y partes blandas	Fallecido
PA16-39	Cepa clínica	ModR	Desconocido	Fallecido
PA16-43	Cepa clínica	ModR	Urinario	Fallecido

PA16-60	Cepa clínica	MultiS	Abdominal	No fallecido
PA17-01	Cepa clínica	XDR	Respiratorio	Fallecido
PA17-02	Cepa clínica	XDR	Desconocido	No fallecido
PA17-03	Cepa clínica	XDR	Desconocido	Fallecido
PA17-04	Cepa clínica	XDR	Piel y partes blandas	Fallecido
PA17-05	Cepa clínica	XDR	Respiratorio	Fallecido
PA17-06	Cepa clínica	XDR	Urinario	No fallecido
PA17-07	Cepa clínica	XDR	Urinario	No fallecido
PA17-08	Cepa clínica	XDR	Respiratorio	Fallecido
PA17-09	Cepa clínica	XDR	Urinario	No fallecido
PA17-10	Cepa clínica	XDR	Abdominal	Fallecido
PA17-11	Cepa clínica	XDR	Respiratorio	Fallecido
PA17-12	Cepa clínica	XDR	Catéter	No fallecido
PA17-13	Cepa clínica	XDR	Respiratorio	Fallecido
PA17-14	Cepa clínica	XDR	Abdominal	No fallecido
PA17-15	Cepa clínica	XDR	Respiratorio	Fallecido
PA17-26	Cepa clínica	ModR	Abdominal	No fallecido
PA17-27	Cepa clínica	ModR	Urinario	Fallecido
PA17-30	Cepa clínica	ModR	Respiratorio	Fallecido
PA17-33	Cepa clínica	ModR	Respiratorio	Fallecido
PA17-34	Cepa clínica	MultiS	Catéter	No fallecido
PA17-37	Cepa clínica	MultiS	Abdominal	No fallecido
PA17-39	Cepa clínica	ModR	Piel y partes blandas	Fallecido
PAO1	Cepa referencia	MultiS	NA	NA
PA14	Cepa referencia	MultiS	NA	NA

MDR: multirresistente; XDR: extremadamente resistente; ModR: moderadamente resistente; MultiS: multisensible; NA: no aplicable.

De las 38 cepas clínicas seleccionadas, 17 fueron no MDR, mientras que las 21 cepas restantes mostraban un patrón de resistencia MDR/XDR. De estas últimas, se seleccionaron 17 cepas como representantes de los clones epidémicos de alto riesgo descritos previamente en nuestra institución (ST175 y ST235). Las 4 cepas restantes pertenecían a cepas MDR/XDR no clonales. Las dos cepas de referencia (PAO1 y PA14) fueron sensibles a todos los antibióticos ensayados. En todas las cepas, además de los ensayos *in vitro* e *in vivo*, se determinó la sensibilidad antibiótica y el perfil de resistencia, la detección de carbapenemasas (*bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{IMP-1} y *bla*_{IMP-2}), su estructura poblacional mediante PFGE y MLST, la presencia de genes del SST3 (*exoS*, *exoT*, *exoU*, *exoY*) y el serotipo del antígeno O (O1-O16) según los protocolos y bases de datos descritos previamente en el apartado de investigación clínica.

2.3. Ensayos de citotoxicidad celular

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo siguiendo los protocolos descritos por Hawdon *et al.* (220) y Pérez-Gallego *et al.* (221).

2.3.1. Cultivo celular

Todos los procedimientos realizados con cultivos celulares se llevaron a cabo en una cabina de flujo laminar con un nivel 2 de bioseguridad para mantener el buen estado celular y evitar la contaminación de los cultivos. Se empleó la línea celular humana A549 de epitelio alveolar tipo II (Cell Line Service, Eppelheim, Alemania). Las células se mantuvieron en botellas de 75 cm² con 20 mL de medio de mantenimiento DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, tampón HEPES 10 mM y solución de antibiótico-antimicótico 1X, incubándose a 37°C con 90% de humedad y 5% de CO₂. Se realizaron pases de las células a botellas con medio de mantenimiento fresco cada 3-4 días, una vez alcanzada la confluencia (80-90%), diluyendo la concentración a aproximadamente 1:5. Para la separación de las células adheridas a la superficie de las botellas se emplearon 3 mL de la solución 1X de tripsina-EDTA al 0.25% (Gibco-Life Technologies, Carlsbad, California, EEUU).

El día previo a la infección se separaron las células A549 de la botella con 3 mL de tripsina-EDTA al 0.25%, se lavaron centrifugando 5 minutos a 1000 rpm con tampón PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) (Biowest, Nuaillé, Francia), y finalmente, se resuspendieron en medio de mantenimiento. A continuación, se añadió 1 mL de dicho medio con las células a cada pocillo de las placas de 24 pocillos, siendo el número aproximado de células/pocillo de 10⁵, y se incubó a 37°C con 90% de humedad y 5% de CO₂ durante 24 horas. Al día siguiente, se eliminó el medio de los pocillos, se lavaron las células (crecidas hasta una confluencia aproximada del 80%) con 1 mL de PBS y se infectaron con las cepas de interés en medio de infección RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (Biowest), tampón HEPES 10 mM, L-glutamina 2 mM, pero sin rojo fenol como indicador de pH (para no interferir con los ensayos posteriores).

2.3.2. Preparación de los inóculos bacterianos

Todas las cepas de *P. aeruginosa* se cultivaron durante 24 horas a 37°C en placas de agar sangre. El día antes de la infección, se recogió una colonia con un asa estéril y se diluyó en 5 mL de medio LB líquido y se incubaron *overnight* a 37°C en agitación a 180 rpm con posterior renovación mediante dilución 1:50 en medio LB e incubación a 37°C y en agitación a 180 rpm durante 2-3 horas, hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5 ($\approx 5 \times 10^8$ bacterias/mL). La infección se realizó con una

MOI (*multiplicity of infection*) de 100, equivalente a una concentración de aproximadamente 10^7 bacterias/500 μ L por pocillo. Para la determinación de dicha concentración se tuvo en cuenta la relación establecida de $DO_{600}=1$ ($\approx 10^9$ bacterias/mL). Para comprobar que los cálculos correspondían a las UFC de interés, se hicieron siembras de diferentes diluciones en placas de agar sangre por cada cepa, se incubaron 24 horas a 37°C y los recuentos se efectuaron al día siguiente. Tras 3 horas de incubación a 37°C, se recogió el medio de los pocillos y se almacenó a -80°C para realizar los análisis posteriores de citotoxicidad. Se infectaron tres pocillos por cepa a estudio y placa, y se repitió la infección en tres experimentos independientes.

2.3.3. Evaluación de la respuesta citotóxica: determinación de lactato deshidrogenasa (LDH)

Para evaluar la respuesta citotóxica se utilizó como indicador la liberación de LDH citosólico provocado por el daño celular ocasionado por las bacterias con el *Cytotoxicity Detection Kit PLUS* (Roche, Basilea, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se preparó en tubos de microcentrífuga la mezcla de reactivos incluidos en el *kit*, de forma que para cada muestra se añadieron y mezclaron con una micropipeta 112.5 μ L de reactivo *catalyst* y 2.5 μ L del reactivo *dye*. De dicha mezcla se repartieron seguidamente 100 μ L en una placa de microtitulación. De cada muestra, previamente centrifugada en una microcentrífuga durante 5 minutos a unos 14.000 rpm (para eliminar bacterias y los restos celulares), se adicionaron 100 μ L a los pocillos de la placa con la mezcla de reactivos, mezclándose 2-3 veces con la micropipeta. Se incubó 30 minutos a Tª ambiente y en oscuridad. Se añadieron 50 μ L de la solución *stop* a cada pocillo para detener la reacción, y se midió la absorbancia de los pocillos a 492 nm, empleándose PBS como blanco. Finalmente, se calculó la LDH presente en cada muestra mediante la siguiente expresión:

$$\frac{ABS_{492} \text{ muestra} - ABS_{492} \text{ control celular}}{ABS_{492} \text{ máximo} - ABS_{492} \text{ control celular}} \times 100$$

ABS₄₉₂ control celular: valor correspondiente a la LDH liberada al medio por las células en condiciones normales (pocillo con 500 μ L de medio de infección sin bacterias, 3 horas).

ABS₄₉₂ máximo: valor máximo posible de LDH en una muestra tras lisar las células de un pocillo al añadir 1 μ L de Tritón X-100 a 500 μ L de medio de infección sin bacterias, dejando actuar unos 10 minutos y mezclando varias veces con la micropipeta.

El control celular correspondería a la liberación de LDH por un pocillo de células A549 sin infectar. Se utilizaron células lisadas con el detergente Tritón X-100, para determinar el valor máximo que se consideró el 100% de LDH liberado por un pocillo de células A549. Los resultados se representaron como el porcentaje (%) de LDH liberada con respecto del máximo. Se usaron al menos un control celular y un control máximo por placa de infección.

2.4. Ensayos de letalidad con *C. elegans*

Los ensayos de letalidad con *C. elegans* se llevaron a cabo siguiendo los protocolos descritos por Navas *et al.* (199) y Sánchez-Diener *et al.* (207,208).

2.4.1. Preparación de *C. elegans*

Se llevó a cabo el crecimiento masivo de *C. elegans* en placas con medio PDA (*Potato Dextrosa Agar*) de 80 mm de diámetro durante 48-72 horas. Una vez alcanzada una población adecuada (elevado número de nematodos y móviles), se cortó el agar en trozos y se suspendieron encima de un recipiente con un filtro de 90 μm en la parte superior y se enrasó con agua destilada. Se dejó decantar durante 18-24 horas con el fin de que los nematodos pasaran a través del filtro y quedasen en el agua (separados del agar). Tras esto, se hizo pasar el volumen de agua por un filtro de 20 μm con el fin de retener a los nematodos. Una vez se obtuvieron los nematodos separados, se suspendieron en una solución de agua destilada. Tras esto, los nematodos se lavaron con agua destilada estando listos para el ensayo de virulencia (Figura 14).

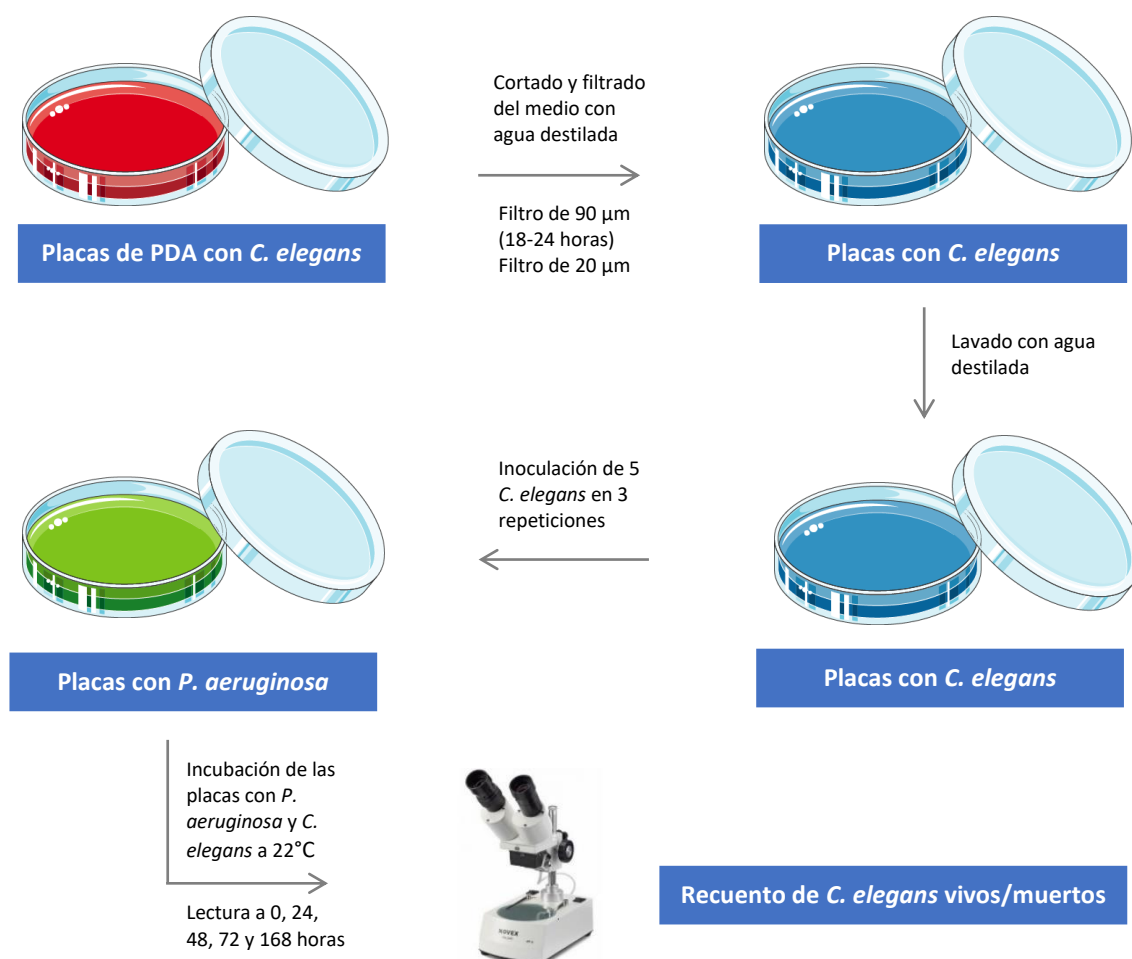


Figura 14. Protocolo de preparación del ensayo de virulencia de *P. aeruginosa* en *C. elegans*.

2.4.2. Preparación de las cepas bacterianas

Todas las cepas de *P. aeruginosa* se cultivaron durante 24 horas a 37°C en placas de agar sangre. Partiendo de estos cultivos, se prepararon inóculos con una turbidez similar a un 0.5 de la escala de McFarland ($\approx 10^8$ UFC/mL) de las cepas y se sembraron en placas de medio PDA de 55 mm de diámetro con el fin de conseguir un tapiz o césped bacteriano. Se dejaron incubar durante 24 horas a 37°C. Se prepararon 3 placas iguales por cepa a estudio, y se repitió el ensayo en tres experimentos independientes. Se usó como control no patogénico la cepa de *E. coli* OP50 (ECOP50), utilizada para alimentar a los nematodos.

2.4.3. Realización de los ensayos de virulencia

Se vertieron 5 nematodos de *C. elegans* L3-L4 en cada una de las 3 repeticiones de las cepas de *P. aeruginosa* a estudio y se incubaron a 22°C durante 24 horas. Tras la incubación, se realizó un recuento con ayuda de una lupa-microscopio a 20x y 40x de aumento. Se anotaron los nematodos vivos y muertos. Se realizó la misma operación a las 48, 72 y 168 horas. Se consideraron muertos aquellos nematodos que no se movían espontáneamente. De los resultados obtenidos se realizó un análisis integral comparativo de la letalidad producida por cada cepa utilizando el sistema de puntuación *C. elegans* Virulence Score (CEVS) (207,208). De esta manera, los aislamientos se clasificaron en 5 niveles de virulencia dependiendo del efecto sobre el crecimiento de los nematodos a lo largo de los siete días de duración del experimento, incluyendo dos niveles (CEVS 1 y 2) en los que las cepas se consideraron de baja virulencia (supervivencia de los nematodos) y tres niveles (CEVS 3, 4 y 5) de media-alta virulencia (letalidad de los nematodos) (**Tabla 14**). Para la recogida de los datos del experimento y con arreglo al protocolo detallado previamente, se diseñó una hoja de datos digitalizada con el programa Microsoft® Excel para Windows (**Anexo 2**).

Tabla 14. *Caenorhabditis elegans* Virulence Scoring (CEVS).

CEVS	Número de nematodos vivos a 168 horas
No virulento	
1	>50
2	>5-50
Virulento	
3	1-5
4	≤ 1
5	0 ^a

^aRecuento a las 72 horas. Adaptado de Sánchez-Diener *et al.* (207,208).

2.5. Análisis estadístico

Mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov se realizó un estudio de normalidad de la muestra y en función de los resultados, las variables continuas fueron expresadas como media \pm desviación estándar (DE) o mediana y rango intercuartílico (RIQ). Las comparaciones fueron realizadas mediante el test de t de Student si la distribución era normal o con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney si no lo era. En cuanto a las variables categóricas se expresaron como números absolutos (n) o porcentajes (%) y se compararon mediante χ^2 o test exacto de Fisher. El criterio para la significación estadística fue de $P < 0.05$. Para el análisis estadístico y la representación gráfica se utilizó el *software* GraphPad Prism versión 5 (GraphPad, La Jolla, California, EEUU).

2.6. Aspectos éticos

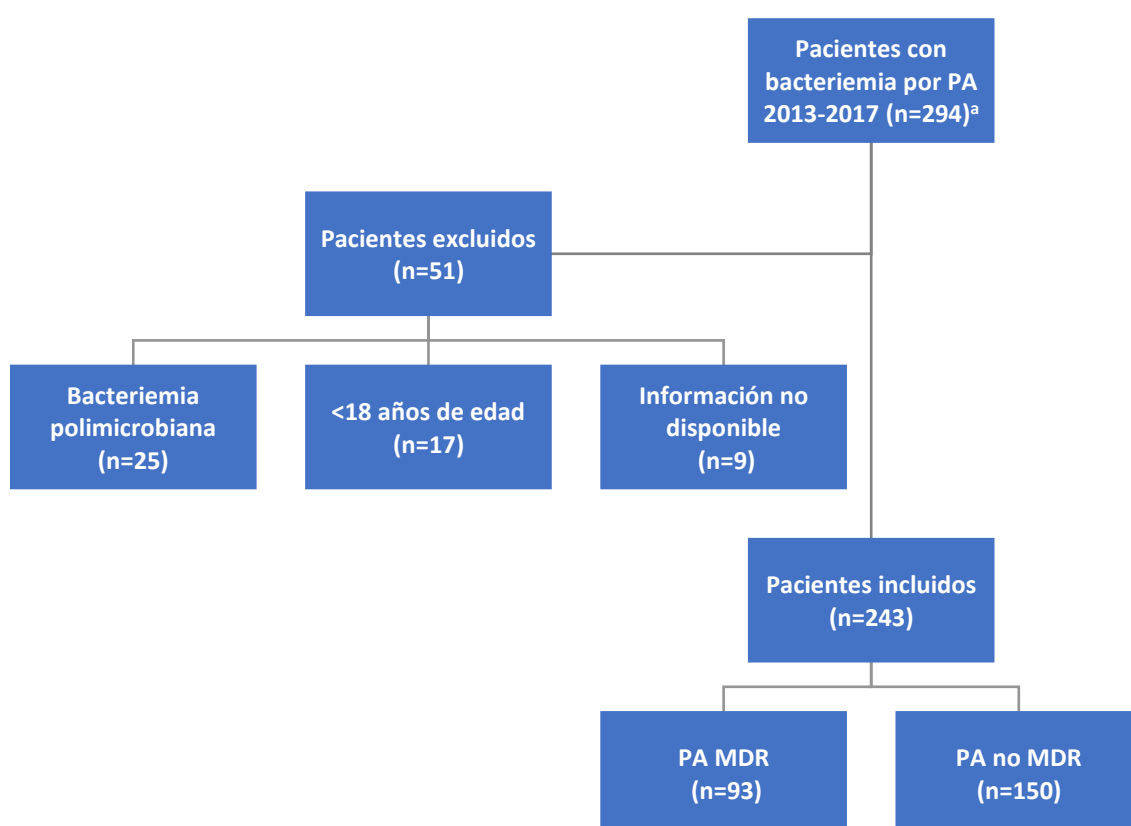
Cabe destacar que *C. elegans* no presenta problemas éticos en los proyectos de investigación pues legalmente no está sometido a las disposiciones del RD 53/2013, de 1 de febrero sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. El protocolo original del estudio clínico (investigador principal: Fernando Chaves) a partir del cual se ha diseñado la presente investigación fue aprobado por la Comisión de Investigación del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (imas12), no considerando necesaria la solicitud de consentimiento informado por el carácter observacional y retrospectivo de la misma (referencia: TP17/0041), con fecha 3 de febrero de 2017 (**Anexo 3**).

RESULTADOS

1. Características clínico-epidemiológicas de la bacteriemia por *P. aeruginosa*

1.1. Descripción de la cohorte global

Durante el periodo de estudio comprendido entre el 1 de enero de 2013 y el 31 de diciembre de 2017, se incluyeron un total de 294 episodios no duplicados de bacteriemia por *P. aeruginosa*. De éstos, fueron excluidos 51 episodios: 25 de ellos por el hallazgo concomitante de otro aislamiento en el hemocultivo además de *P. aeruginosa* (bacteriemia polimicrobiana), 17 de ellos por corresponder a pacientes menores de 18 años, y 9 de ellos por no tener suficiente información clínica o microbiológica del episodio. Por lo que finalmente se estudiaron en profundidad 243 episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa* (Figura 15).



^aEpisodios no duplicados de bacteriemia por *P. aeruginosa*. PA: *Pseudomonas aeruginosa*; MDR: multirresistente.

Figura 15. Proceso de inclusión de los episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa*.

Dentro de la cohorte global, hubo un paciente que presentó 2 episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa*, el primero de ellos en 2015 y el segundo en 2016. En ambos casos se trató de una bacteriemia secundaria a foco urinario en paciente portador de sondaje vesical. Los aislamientos presentaron diferente fenotipo, por lo que fueron considerados episodios independientes.

1.2. Incidencia

El número total de aislamientos de *P. aeruginosa* teniendo en cuenta cualquier muestra clínica procedente tanto del ámbito comunitario como hospitalario en el tiempo que duró el estudio fue de 8.046 (1.232 en 2013, 1.529 en 2014, 1.925 en 2015, 1.815 en 2016 y 1.545 en 2017). Las bacteriemias supusieron el 3.7% de todos los aislamientos de *P. aeruginosa*, con un máximo del 4.5% en 2013 y un mínimo de 3.2% en 2015 (**Figura 16**).

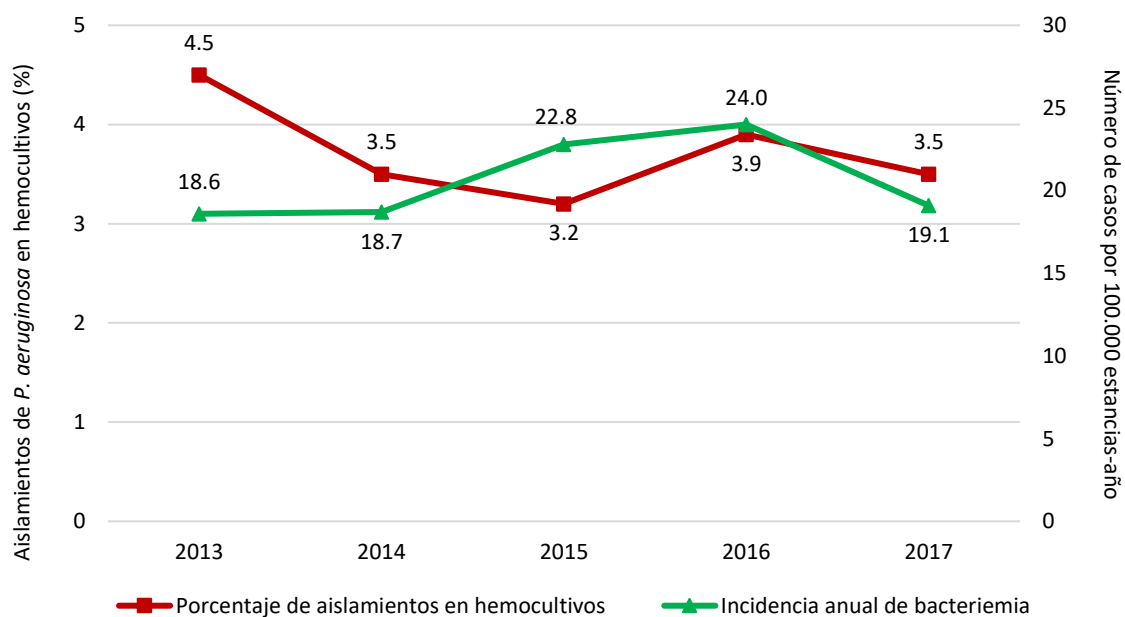


Figura 16. Porcentaje de aislamientos e incidencia anual de bacteriemia por *P. aeruginosa*.

La incidencia global de la bacteriemia por *P. aeruginosa* fue de 20.6 casos por cada 100.000 estancias-año, con un rango que abarcó desde 19 hasta 24 casos por cada 100.000 estancias-año (**Figura 16** y **Tabla 15**). Al evaluar la tendencia, se pudo observar que la incidencia de la bacteriemia por *P. aeruginosa* se incrementaba de forma relativa anualmente, aunque de forma no significativa ($P=0.453$).

Tabla 15. Incidencia anual de bacteriemia por *P. aeruginosa* por cada 100.000 estancias-año.

Año	Episodios	Estancias-año	Incidencia (casos por cada 100.000 estancias-año)
2013	55	295.308	18.6
2014	53	283.384	18.7
2015	62	272.471	22.8
2016	70	291.129	24.0
2017	54	283.454	19.1

1.3. Características epidemiológicas

Las características epidemiológicas de la cohorte son detalladas en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Características epidemiológicas basales de la cohorte global.

Variable ^a	n=243
Edad, años (mediana [RIQ])	66.0 (55.0-77.0)
Género masculino (n [%])	161 (66.3)
Comorbilidades e inmunodepresión (n [%])	
Índice de comorbilidad de Charlson (mediana [RIQ])	2 (2-3)
Diabetes mellitus	63 (25.9)
Enfermedad pulmonar crónica	34 (13.9)
Enfermedad renal crónica	41 (16.9)
Enfermedad hepática	15 (6.2)
Neoplasia sólida	50 (20.6)
Neoplasia hematológica	62 (25.5)
Tratamiento inmunosupresor	124 (51.0)
Neutropenia severa (<500 células/mm ³)	58 (23.9)
Trasplante	52 (21.4)
Colonización previa por PA MDR (n [%])	34 (13.9)
Ingreso hospitalario previo (n [%])	149 (61.3)
Ingreso previo en UCI (n [%])	44 (18.1)
Procedimientos invasivos previos (n [%])	
Catéter vascular	146 (60.1)
Catéter urinario	107 (44.0)
Ventilación mecánica	36 (14.8)
Cirugía previa (n [%])	81 (33.3)
Tratamiento antibiótico previo (n [%])	170 (69.9)
Piperacilina-tazobactam	29 (11.9)
Carbapenémicos	54 (22.2)
Fluoroquinolonas	52 (21.4)
Servicio de ingreso (n [%])	
Médico	120 (49.4)
Onco-hematología	51 (21.0)
Quirúrgico	29 (11.9)
UCI	43 (17.7)

^aSe representan las variables más importantes. RIQ: rango intercuartílico; PA: *Pseudomonas aeruginosa*; MDR: multirresistente; UCI: Unidad de Cuidados Intensivos.

La mediana de edad fue 66 (55-77) años, con claro predominio de varones (66.3% [161/243]). El índice de comorbilidad de Charlson abarcó un rango de 0 a 8 puntos, con una mediana de 2 (2-3). Entre las comorbilidades subyacentes destacaron la presencia de diabetes mellitus (25.9% [63/243]), neoplasias hematológicas (25.5% [62/243]) y neutropenia severa (23.9% [58/243]). Hubo un paciente con dos neoplasias hematológicas sincrónicas (leucemia linfática crónica y mieloma múltiple). Aproximadamente una quinta parte de los pacientes (21.4% [52/243]) había recibido previamente un TOS (15.6% [38/243]) o un TCMH (5.8% [14/243]). La mitad de los pacientes había recibido previamente algún tipo de tratamiento inmunosupresor (51.0% [124/243]), fundamentalmente quimioterapia (22.6% [55/243]) y otros inmunosupresores (21.4% [52/243]). Respecto a los factores de riesgo de adquisición de bacteriemia por *P. aeruginosa*, la mayor parte de los pacientes había recibido previamente tratamiento antibiótico (69.9% [170/243]), siendo los más frecuentes los carbapenémicos (22.2% [54/243]) y las fluoroquinolonas (21.4% [52/243]). Del conjunto de pacientes, 44 (18.1%) habían tenido una estancia de al menos 48 horas en una UCI durante el mes previo. Los procedimientos invasivos más frecuentes fueron la colocación de catéter vascular (60.1% [146/243]), seguido de catéter urinario (44.0% [107/243]) y VM (14.8% [36/243]). Hubo 81 (33.3%) pacientes que habían sido sometidos a algún tipo de intervención quirúrgica mayor en el mes previo al episodio de bacteriemia. De toda la cohorte, en 34 (13.9%) pacientes se había constatado la colonización previa por *P. aeruginosa* MDR/XDR con el mismo fenotipo que el aislamiento del hemocultivo. La mayor parte de los pacientes (88.1% [214/243]) procedían de servicios médicos (49.4% [120/243]), Onco-Hematología (21.0% [51/243]) y UCI (17.7% [43/243]).

1.4. Características clínicas

Las características clínicas de los episodios de bacteriemia son mostradas en la **Tabla 17**. Según su procedencia, la mayoría de los episodios se consideraron de adquisición nosocomial (56.4% [137/243]) o asociados al cuidado sanitario (33.7% [82/243]). Menos frecuentes fueron las bacteriemias de adquisición comunitaria (9.9% [24/243]). Teniendo en cuenta el origen de la bacteriemia, los focos más frecuentes fueron los considerados de alto riesgo (61.7% [150/243]), principalmente el foco respiratorio (22.6% [55/243]) y el foco abdominal (20.6% [50/243]). De los focos de bajo riesgo (38.3% [93/243]), el más frecuente fue el de origen urinario (27.6% [67/243]). En 3 (1.2%) pacientes se identificaron otros focos. De entre las bacteriemias de origen respiratorio, sólo el 25.5% (14/55) de los pacientes habían recibido VM previamente. En contraposición, el catéter urinario estuvo presente en el 74.6% (50/67) de los pacientes con bacteriemia de origen urinario.

Tabla 17. Características clínicas de los episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa*.

Variable ^a	n=243
Adquisición (n [%])	
Nosocomial	137 (56.4)
Asociada al cuidado sanitario	82 (33.7)
Comunitaria	24 (9.9)
Foco de la bacteriemia (n [%])	
Alto riesgo	150 (61.7)
Desconocido	26 (10.7)
Respiratorio	55 (22.6)
Abdominal	50 (20.6)
Piel y partes blandas	19 (7.8)
Bajo riesgo	
Urinario	67 (27.6)
Catéter vascular	23 (9.5)
Otros	3 (1.2)
Presentación clínica (n [%])	
Pitt score ≥ 2	135 (55.6)
Shock séptico	66 (27.2)
Ingreso en UCI	48 (19.8)
Tratamiento empírico inadecuado (n [%])	85 (35.0%)
Mortalidad (n [%])	
Mortalidad global temprana (mortalidad a 5 días)	49 (20.2)
Mortalidad global tardía (mortalidad a 30 días)	81 (33.3)
Mortalidad atribuible	69 (28.4)

^aSe representan las variables más importantes. UCI: Unidad de Cuidados Intensivos.

En cuanto a las manifestaciones clínicas y gravedad de los episodios de bacteriemia, el síntoma que motivó la extracción del hemocultivo en la mayoría de los casos fue la fiebre (95.9% [233/243]), mientras que otras causas fueron la hipotensión y la dificultad respiratoria. El índice de Pitt abarcó un rango de 0 a 9 con una mediana de 2 (0-3). Más de la mitad de los pacientes presentaron un Pitt score mayor o igual a 2 (55.6% [135/243]). La proporción de episodios graves (Pitt ≥ 2) según el índice de Pitt fue mayor en los episodios de origen respiratorio (80.0% [44/55]) y menor en los de origen urinario (31.3% [21/67]). De los 243 pacientes, 66 (27.2%) desarrollaron shock séptico tras la bacteriemia, que se produjo dentro de las primeras 48 horas en 62 (93.9%) pacientes. Hubo 48 (19.8%) pacientes que ingresaron en UCI, un 60.4% (29/48) de ellos como consecuencia directa de la bacteriemia y en todos los casos en las primeras 48 horas.

Las bacteriemias secundarias a foco respiratorio ingresaron en UCI con mayor frecuencia (30.9% [17/55]) y precisaron de soporte vasoactivo y VM en mayor proporción. Respecto a la evolución de los episodios de bacteriemia, hubo 81 (33.3%) pacientes que fallecieron, por cualquier causa, en los primeros 30 días (mortalidad tardía) tras el inicio del episodio de bacteriemia. En 49 (60.5% de fallecidos y 20.2% del total) pacientes la mortalidad tuvo lugar en los primeros 5 días (mortalidad precoz) tras el inicio del episodio de bacteriemia. En 69 (85.2% de fallecidos y 28.4% del total) casos, la bacteriemia y sus complicaciones fueron la causa fundamental de la muerte de los pacientes, considerándose atribuible al episodio de bacteriemia.

1.5. Tratamiento antibiótico empírico y control del foco

De los 243 pacientes, 242 (99.6%) recibieron tratamiento antibiótico empírico tras el inicio del episodio de bacteriemia. Un paciente no recibió ningún tratamiento antibiótico de forma empírica por decisión del equipo médico responsable, en el contexto de limitación del esfuerzo terapéutico. Los antibióticos elegidos con mayor frecuencia como tratamiento empírico fueron meropenem (52.3% [127/243]), amikacina (20.6% [50/243]) y piperacilina-tazobactam (14.4% [35/243]). El tratamiento antibiótico empírico se realizó con un solo antibiótico en 126 (52.1%) pacientes y en combinación en 116 (47.9%). El tratamiento empírico combinado se realizó con 2 antibióticos en 94 (38.7%) pacientes, con 3 en 18 (7.4%) y con 4 en 4 (1.6%). Los antibióticos más usados en monoterapia fueron meropenem (25.9% [63/243]) y piperacilina-tazobactam (12.3% [30/243]). Las combinaciones antibióticas más frecuentes fueron meropenem-amikacina (13.2% [32/243]) y meropenem-colistina (10.3% [25/243]). El tratamiento empírico fue adecuado en 158 (65.0%) pacientes. La causa más frecuente de que el tratamiento antibiótico empírico fuera inadecuado fue la ausencia de actividad del antibiótico según el antibiograma del aislamiento en el 62.4% (53/85) de los casos. En el 37.6% (32/85) de los episodios no se utilizó ningún antibiótico con actividad frente a *P. aeruginosa*. La probabilidad de que el tratamiento fuera adecuado fue del 50% (63/126) cuando se usó un antibiótico, del 78.7% (74/94) cuando se usaron 2 antibióticos y del 100% cuando se usaron 3 (18/18) o 4 (4/4) antibióticos. En conjunto, el tratamiento antibiótico empírico combinado mostró mayores probabilidades de ser adecuado en comparación con la monoterapia (79.3% versus 50.0%, $P < 0.001$). Hubo 2 (0.8%) pacientes en los que se limitó finalmente el esfuerzo terapéutico debido a sus condiciones basales (tratamiento paliativo), no recibiendo tratamiento dirigido. El control del foco séptico se llevó a cabo en 70 (28.8%) pacientes, mediante retirada del catéter vascular (32.9% [23/70]), recambio de sondaje urinario (47.1% [33/70]) y drenaje de colecciones (20% [14/70]) en las primeras 24-72 horas tras el inicio del episodio de bacteriemia.

2. Características microbiológicas de la bacteriemia por *P. aeruginosa*

Las características microbiológicas de las cepas de *P. aeruginosa* son detalladas en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Características microbiológicas de las cepas de *P. aeruginosa*.

Variable ^a	n=243
Fenotipo de resistencia (n [%])	
No MDR	150 (61.7)
MultiS	23 (9.5)
ModR	127 (52.3)
MDR	93 (38.3)
No XDR	6 (2.5)
XDR	87 (35.8)
Tipo de carbapenemasa (n [%])	
VIM-2	43 (17.7)
GES-5	33 (13.6)
Genotipo del SST3 (n [%])	
<i>exoU</i> ⁺ / <i>exoS</i> ⁻	50 (20.6)
<i>exoU</i> ⁻ / <i>exoS</i> ⁺	185 (76.1)
<i>exoU</i> ⁻ / <i>exoS</i> ⁻	8 (3.3)
Serotipo del antígeno O (n [%])	
O1	38 (15.6)
O4	50 (20.6)
O6	38 (15.6)
O11	37 (15.2)
Otro	80 (32.9)
TP del hemocultivo, horas (mediana [RIQ])	16.0 (12.0-19.0)

^aSe representan las variables más importantes. MDR: multirresistente; XDR: extremadamente resistente; SST3: sistema de secreción tipo 3; TP: tiempo hasta positividad; RIQ: rango intercuartílico.

2.1. Fenotipo de resistencia

La mayor parte de las cepas mostraron un fenotipo no MDR (61.7% [150/243]), siendo en su mayoría ModR (84.7% [127/150] de las cepas no MDR y 52.3% [127/243] del total) y en menor frecuencia MultiS (15.3% [23/150] de las cepas no MDR y 9.5% [23/243] del total). Por el contrario, hubo un total de 93 (38.3%) cepas con perfil MDR, con una mayor representación del fenotipo XDR (93.5% [87/93] de las cepas MDR y 35.8% [87/243] del total) y en menor frecuencia no XDR (6.5% [6/93] de las cepas MDR y 2.5% [9/243] del total). El patrón de sensibilidad antibiótica de los 243 aislamientos de *P. aeruginosa* aparece detallado en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Patrón de sensibilidad antibiótica de los aislamientos de *P. aeruginosa*.

Aislamientos (n [%])	PIP/TZ ≤16 mg/L	CAZ ≤8 mg/L	FEP ≤8 mg/L	ATM ≤16 mg/L	IMP ≤4 mg/L	MER ≤2 mg/L	GEN ≤4 mg/L	TOB ≤4 mg/L	AMI ≤8 mg/L	CIP ≤0.5 mg/L	COL ≤2 mg/L	TOL/TZ ≤4 mg/L	CAZ/AVI ≤8 mg/L
Total (n=243)	154 (63.4)	152 (62.6)	152 (62.6)	26 (10.7)	144 (59.3)	144 (59.3)	157 (64.6)	163 (67.1)	205 (84.4)	133 (54.7)	243 (100)	10 (11.2)	43 (49.4)
MDR (n=93)													
No XDR (n=6)	2 (33.3)	2 (33.3)	2 (33.3)	0 (0)	4 (66.7)	5 (91.7)	5 (91.7)	5 (91.7)	6 (100)	4 (66.7)	6 (100)	ND	ND
XDR (n=87)	2 (2.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (4.5)	9 (10.1)	49 (56.3)	0 (0)	87 (100)	10 (11.2)	43 (49.4)
VIM-2 (n=43)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	43 (100)	0 (0)	43 (100)	0 (0)	0 (0)
GES-5 (n=33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	33 (100)	0 (0)	33 (100)
Otros ^a (n=11)	2 (18.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (36.4)	9 (81.8)	6 (54.5)	0 (0)	11 (100)	10 (90.9)	10 (90.9)
No MDR (n=150)													
ModR (n=127)	127 (100)	127 (100)	127 (100)	3 (2.3)	117 (92.2)	116 (91.3)	125 (98.4)	126 (99.2)	127 (100)	106 (83.4)	127 (100)	ND	ND
Multis (n=23)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	ND	ND

MDR: multirresistente; XDR: extremadamente resistente; ModR: moderadamente resistente; MultiS: multisensible; PIP/TZ: piperacilina-tazobactam; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; ATM: aztreonam; IMP: imipenem; MER: meropenem; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AMI: amikacina; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; TOL/TZ: ceftolozano-tazobactam; CAZ/AVI: ceftazidima-avibactam; ND: no disponible.

^aNo se identificaron genes de carbapenemasa (*bla_{KPC}*, *bla_{GES}*, *bla_{VIM-1}*, *bla_{VIM-2}*, *bla_{IMP-1}*, *bla_{IMP-2}*).

De la familia de los β -lactámicos, algo más de la mitad de los aislamientos fueron sensibles a ceftazidima (62.6% [152/243]), cefepime (62.6% [152/243]), imipenem (59.3% [144/243]) y meropenem (59.3% [144/243]). El porcentaje de sensibilidad a aztreonam, siguiendo las guías EUCAST v.8.1., fue muy bajo (10.7% [26/243]) con una CMI₉₀ de 4 mg/L. En cuanto a las combinaciones de β -lactámicos con inhibidores, el 63.4% (154/243) de los aislamientos fueron sensibles a piperacilina-tazobactam. El porcentaje de sensibilidad a ciprofloxacino fue menor (54.7% [133/243]). De los aminoglucósidos ensayados, la amikacina es la que mostró mayor sensibilidad *in vitro* (84.4% [205/243]), seguida de la tobramicina (67.1% [163/243]) y la gentamicina (64.6% [157/243]). Todos los aislamientos fueron sensibles a colistina. En cuanto a las nuevas combinaciones de β -lactámicos con inhibidores, sólo fueron ensayadas en los aislamientos XDR, siendo ceftazidima-avibactam (49.4% [43/87]) más activa que ceftolozano-tazobactam (11.2% [10/87]). La mayor parte de las cepas XDR fueron únicamente sensibles a colistina (100% [87/87]), amikacina (56.3% [48/87]) y ceftazidima-avibactam (49.4% [43/87]).

2.2. Caracterización molecular de carbapenemasas

De entre los 93 aislamientos MDR, en 76 (81.7%) se detectó la presencia de carbapenemasas. La enzima más frecuentemente detectada fue VIM-2 (46.2% [43/93]) seguida de GES-5 (35.5% [33/93]). Es de resaltar que no se detectaron carbapenemasas tipo KPC ni IMP. Todos los aislamientos portadores de la carbapenemasa VIM-2 fueron positivos en el E-test MBL. Además, los aislamientos que codificaban para VIM-2 fueron únicamente sensibles a amikacina y colistina, mientras que aquellas cepas que codificaban GES-5 fueron solamente sensibles a colistina y ceftazidima-avibactam (**Tabla 19**). En la **Figura 17** se pueden observar los resultados de la PCR del gen *bla*_{GES}.

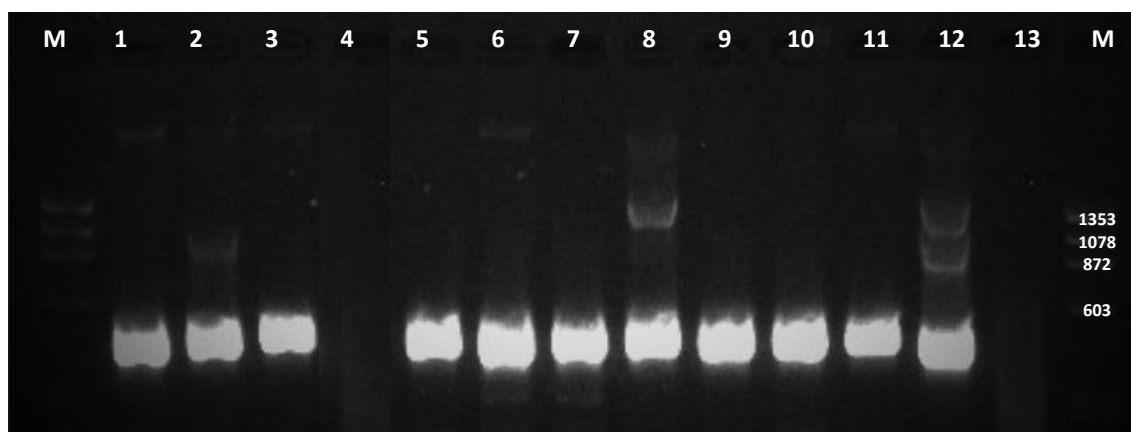


Figura 17. Detección de carbapenemasas por PCR en aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente. Se presenta el gel de agarosa al 1% de la PCR del gen *bla*_{GES}. M: marcador de peso molecular (Φ X174 DNA-Digest); carreras 1,2,3,5,6,7,8,9,10 y 11: detección positiva del gen *bla*_{GES}; carrera 4: detección negativa del gen *bla*_{GES}; carrera 12: control positivo; carrera 13: control negativo.

2.3. Estructura poblacional de *P. aeruginosa* multirresistente

El análisis genotípico de los 76 aislamientos MDR productores de carbapenemasa llevado a cabo por PFGE mostró que 33 aislamientos pertenecían a un único clon mayoritario (clon A) y otros 43 pertenecían a un segundo clon (clon B). En la **Figura 18** se puede observar una representación del patrón electroforético de las cepas pertenecientes a ambos clones.

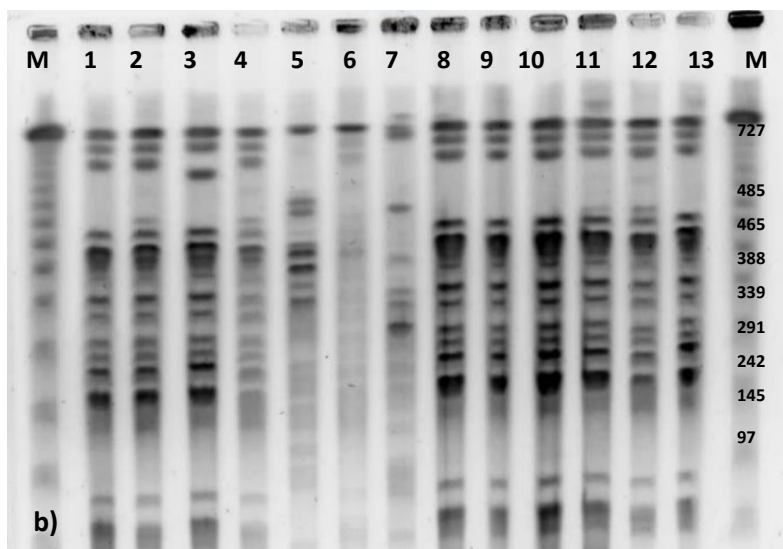
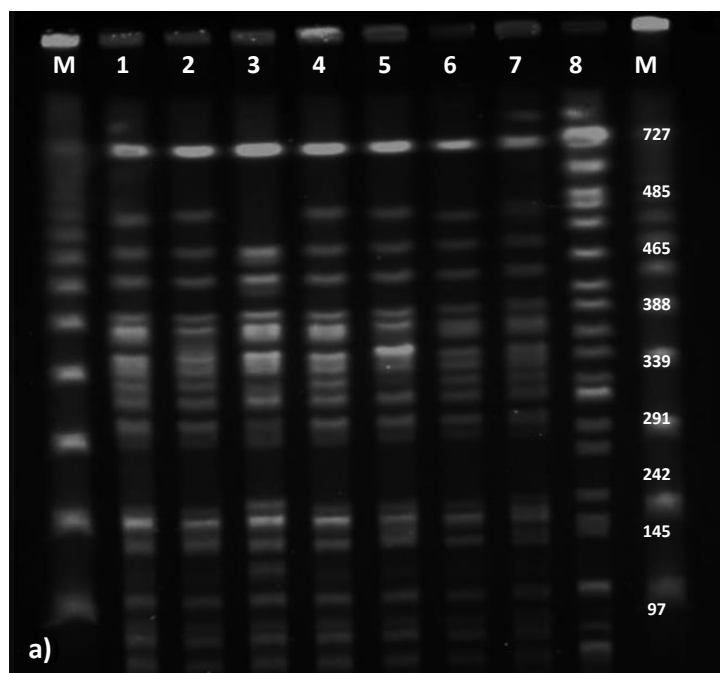


Figura 18. PFGE de aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente pertenecientes a los clones mayoritarios A y B. Se presentan los geles de agarosa de PFGE del clon A (**a**) y clon B (**b**). M: marcador de peso molecular (*lambda ladder* PFGE). (**a**) carreras 1-7: aislamientos pertenecientes al clon A; carrera 8: aislamiento perteneciente a clon no A. (**b**) carreras 1-4 y 8-13: aislamientos pertenecientes al clon B; carreras 5-7: aislamientos pertenecientes a clones no B.

La representación de los distintos pulsotipos de las cepas representativas de *P. aeruginosa* XDR aisladas, se normalizaron en un dendograma donde puede observarse cómo quedan agrupados los aislamientos pertenecientes al clon A (**Figura 19**) y al clon B (**Figura 20**). El análisis de la clonalidad mediante PFGE mostró la agrupación de los aislamientos GES-5 (E-test MBL negativo) en un único clon (clon A) con un 80% de similitud, mientras que los aislamientos VIM-2 (E-test MBL positivo) se agruparon en el otro clon mayoritario (clon B) con una similitud del 90%.

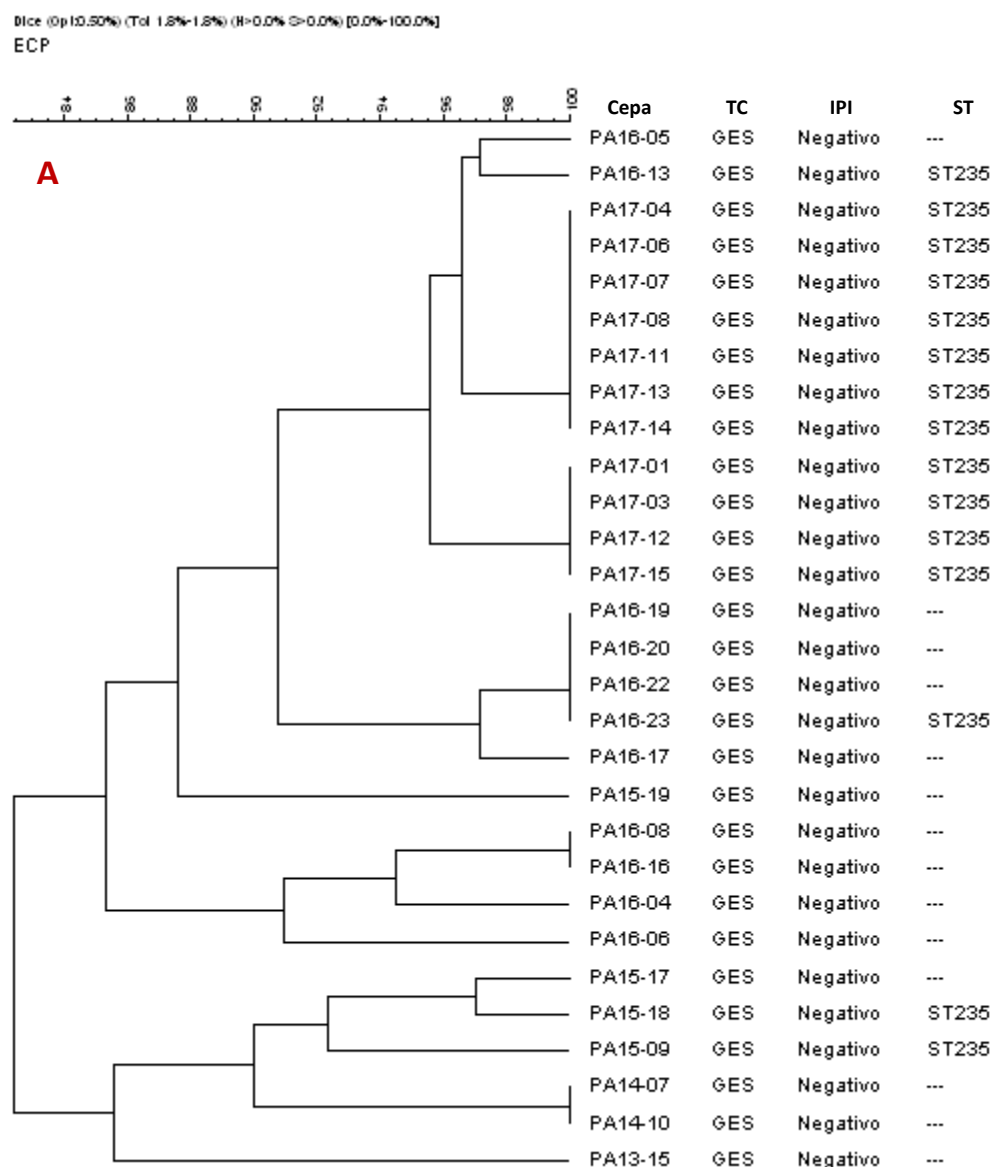


Figura 19. Dendograma y principales características de las cepas de *P. aeruginosa* multirresistente representativas del clon A. ECP: electroforesis en gel de campo pulsado; TC: tipo de carbapenemasa; IPI: E-test MBL; ST: secuencia tipo.

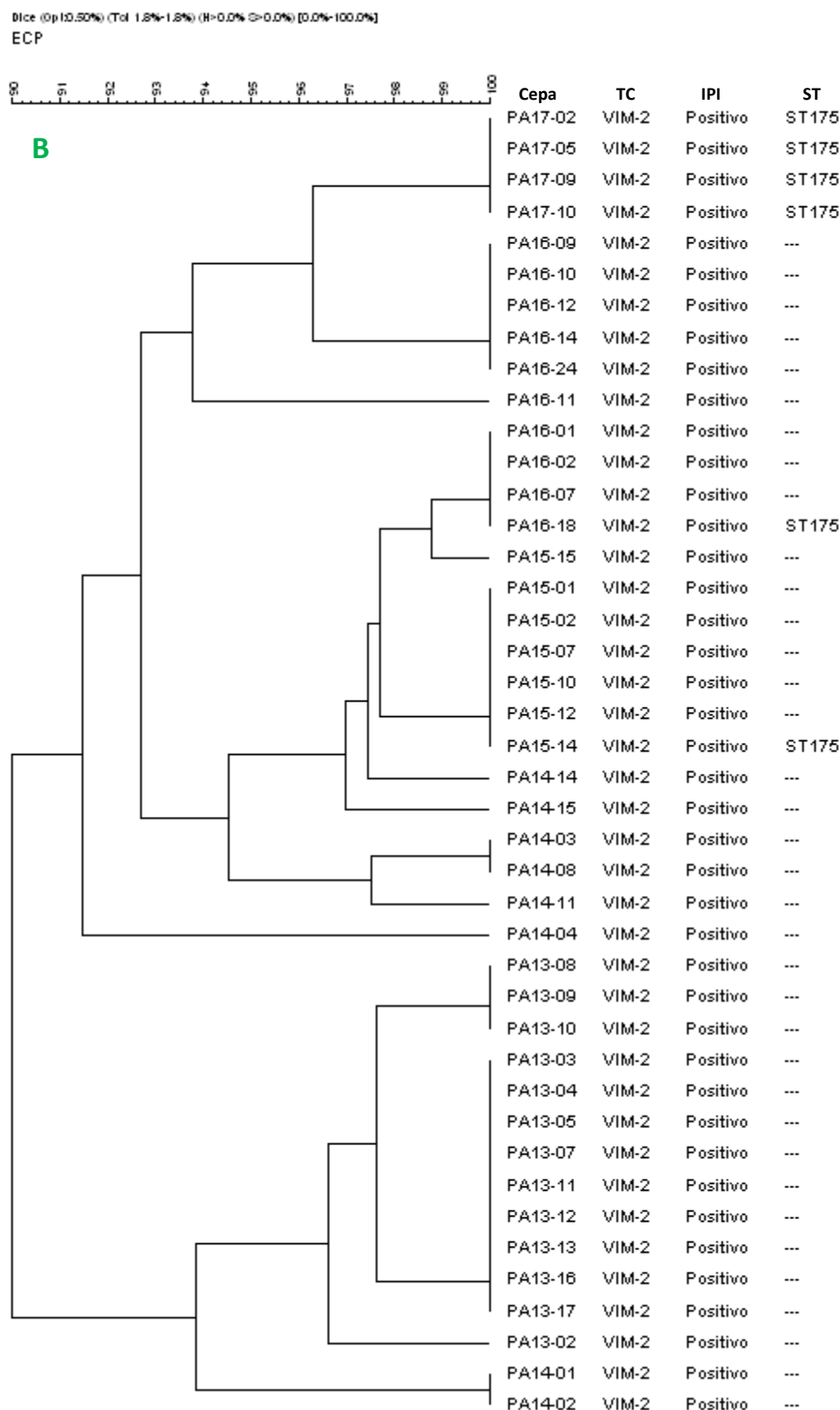


Figura 20. Dendrograma y principales características de las cepas de *P. aeruginosa* multirresistente representativas del clon B. ECP: electroforesis en gel de campo pulsado; TC: tipo de carbapenemasa; IPI: E-test MBL; ST: secuencia tipo.

La técnica de MLST se realizó en aislamientos representativos pertenecientes al clon A (n=15) y al clon B (n=6) para determinar la relación clonal con otros aislamientos previamente descritos. Los aislamientos del clon A y el clon B mostraron diferentes perfiles alélicos (**Tabla 20**). La comparación de este perfil con los disponibles en la base de datos de MLST de *P. aeruginosa*, demostró que las cepas del clon A pertenecían al clon de alto riesgo ST235 mientras que las cepas del clon B pertenecían al clon de alto riesgo ST175.

Tabla 20. Esquema MLST de los clones mayoritarios de *P. aeruginosa* multirresistente.

Cepa	<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>	ST
PA17-01	38	11	3	13	1	2	4	235
PA17-02	28	22	5	3	3	14	19	175
PA17-03	38	11	3	13	1	2	4	235
PA17-04	38	11	3	13	1	2	4	235
PA17-05	28	22	5	3	3	14	19	175
PA17-06	38	11	3	13	1	2	4	235
PA17-07	38	11	3	13	1	2	4	235
PA17-08	38	11	3	13	1	2	4	235
PA17-09	28	22	5	3	3	14	19	175
PA17-10	28	22	5	3	3	14	19	175
PA17-11	38	11	3	13	1	2	4	235
PA17-12	38	11	3	13	1	2	4	235
PA17-13	38	11	3	13	1	2	4	235
PA17-14	38	11	3	13	1	2	4	235
PA17-15	38	11	3	13	1	2	4	235
PA16-13	38	11	3	13	1	2	4	235
PA16-18	28	22	5	3	3	14	19	175
PA16-23	38	11	3	13	1	2	4	235
PA15-09	38	11	3	13	1	2	4	235
PA15-14	28	22	5	3	3	14	19	175
PA15-18	38	11	3	13	1	2	4	235

MLST: *multilocus sequence typing*.

En resumen, los aislamientos pertenecientes al clon de alto riesgo ST175 (carbapenemasa VIM-2, clon B) presentaron un fenotipo de resistencia tipo XDR, únicamente sensibles a amikacina y colistina. Por otro lado, los aislamientos pertenecientes al clon de alto riesgo ST235 (carbapenemasa GES-5, clon A) presentaron un fenotipo de resistencia XDR, únicamente sensibles a colistina y ceftazidima-avibactam (**Tabla 21**).

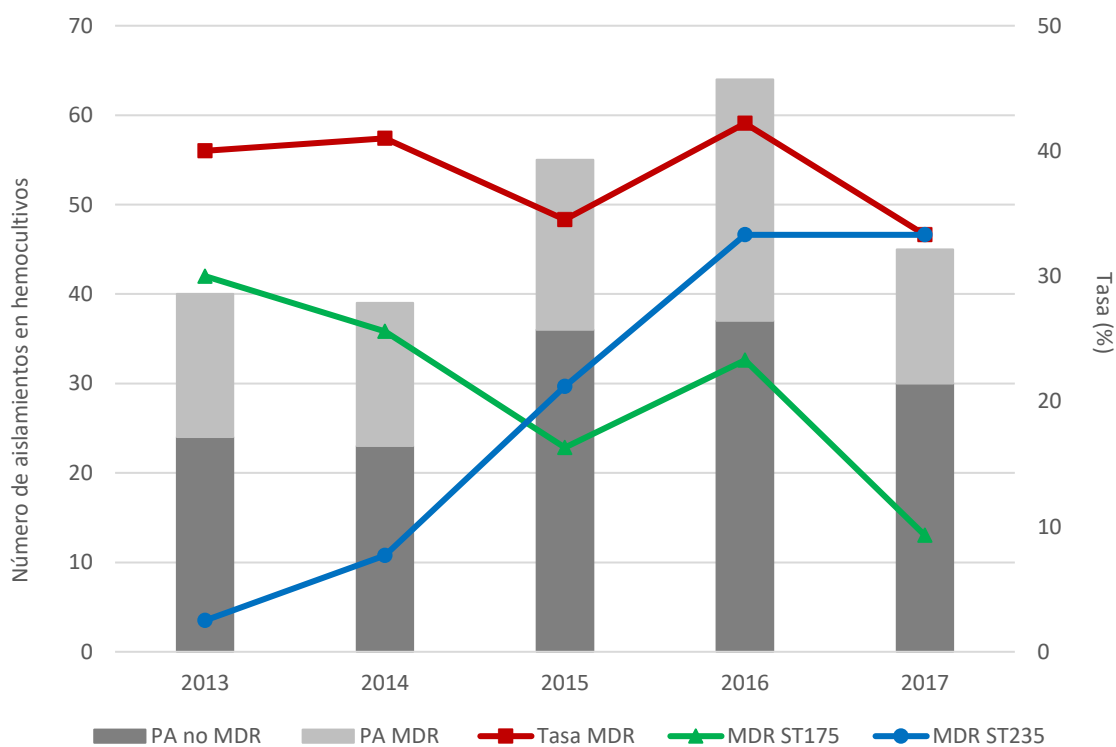
Tabla 21. Fenotipo de resistencia de los clones de alto riesgo ST175 y ST235.

CMI mg/L	CAZ ≤8	FEP ≤8	PIP/TZ ≤16	ATM ≤16	IMP ≤4	MER ≤2	GEN ≤4	TOB ≤4	AMI ≤8	CIP ≤0.5	COL ≤2	TOL/TZ ≤4	CAZ/AVI ≤8
ST175 VIM-2	R	R	R	I ^a	R	R	R	R	S	R	S	R	R
ST235 GES-5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S

CMI: concentración mínima inhibitoria; ST: secuencia tipo; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; PIP/TZ: piperacilina-tazobactam; ATM: aztreonam; IMP: imipenem; MER: meropenem; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AMI: amikacina; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; TOL/TZ: ceftolozano-tazobactam; CAZ/AVI: ceftazidima-avibactam; R: resistente; I: intermedio; S: sensible. ^aCMI₉₀ a aztreonam de 4 mg/L.

2.4. Evolución de la multirresistencia a lo largo del tiempo

La tasa de multirresistencia se mantuvo constante a lo largo de los últimos cinco años en torno a un 38%, con una tasa mínima del 33.3% en 2017 y una tasa máxima del 42.2% en 2016. Dentro de las cepas MDR, se observó un aumento progresivo en la tasa de los aislamientos del clon de alto riesgo ST235 con una tendencia al alza estadísticamente significativa ($P=0.006$). Al contrario, la tasa de aislamientos del clon de alto riesgo ST175 tuvo una tendencia decreciente en los últimos años, aunque ésta no fue estadísticamente significativa ($P=0.099$). La **Figura 21** muestra la evolución a lo largo del tiempo del número de cepas MDR y no MDR de *P. aeruginosa*, la tasa de multirresistencia y la tasa de los clones de alto riesgo ST175 y ST235.



PA: *Pseudomonas aeruginosa*; MDR: multirresistente.

Figura 21. Evolución de *P. aeruginosa* multirresistente durante el periodo de estudio.

2.5. Genotipo del sistema de secreción tipo III

La presencia de los genes *exoT* y *exoY* se documentó en la mayoría de las cepas (96.7% [235/243] y 93.4% [227/243], respectivamente). De forma paralela, todas las cepas fueron positivas para los genes *exoU* o *exoS* (20.6% [50/243] y 76.1% [185/243], respectivamente), excepto 8 (3.3%) cepas que fueron negativas para ambos genes. Los genes *exoU* y *exoS* fueron mutuamente excluyentes. El genotipo *exoU*⁺ se identificó en 33 (66.0%) de las cepas MDR y en 17 (34.0%) de las cepas no MDR. Todas las cepas pertenecientes al clon de alto riesgo ST175 mostraron el genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁺, mientras que todas las cepas asociadas al clon ST235 mostraron el genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻. En la **Figura 22** se pueden observar los resultados de la PCR del gen *exoU*.

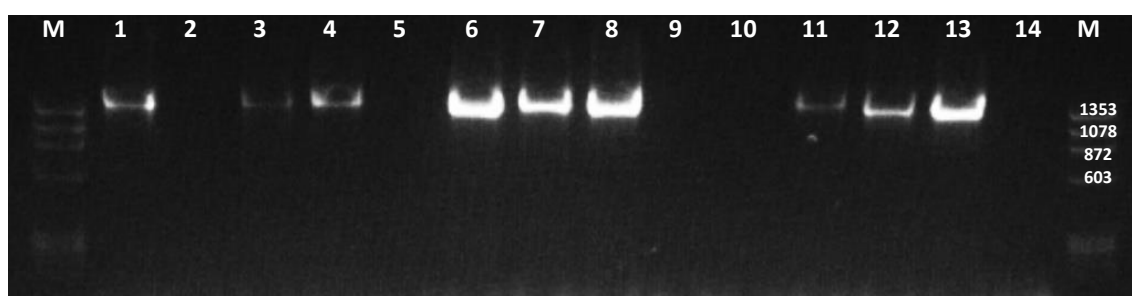


Figura 22. Detección del gen *exoU* por PCR en aislamientos de *P. aeruginosa*. Se presentan el gel de agarosa al 1% de la PCR del gen *exoU*. M: marcador de peso molecular (ΦX174 DNA-Digest). Carreras 1, 3, 4, 6, 7, 8, 11, 12: detección positiva del gen *exoU*; carreras 2, 5, 9 y 10: detección negativa del gen *exoU*; carrera 13: control positivo; carrera 14: control negativo.

2.6. Serotipo del antígeno O

El serotipo del antígeno O se documentó en la mayoría de las cepas (87.7% [213/243]), mientras que 30 (12.3%) aislamientos no aglutinaron con ninguno de los serotipos disponibles, por lo que se consideraron como no tipables (**Figura 23**).

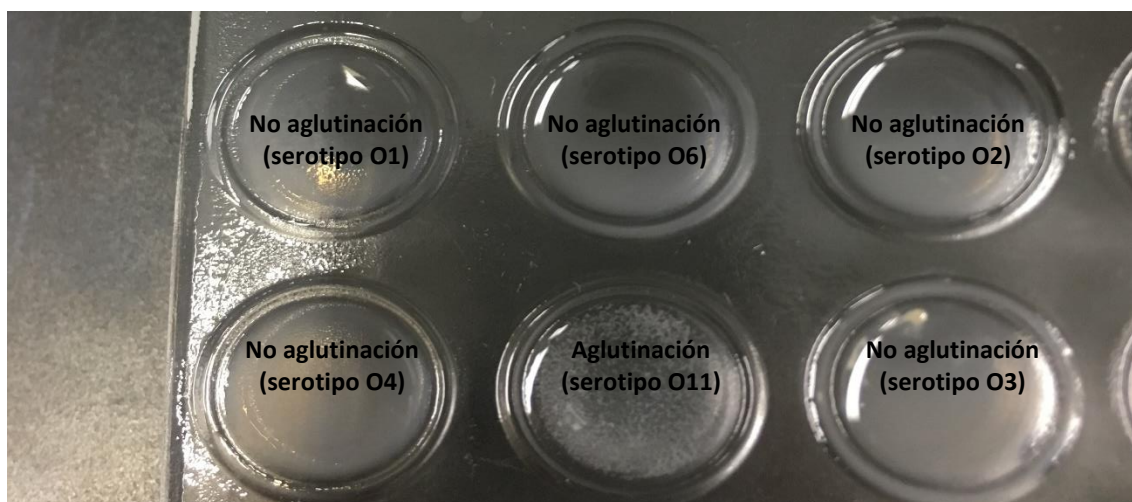


Figura 23. Aglutinación con antisueros específicos del antígeno O de *P. aeruginosa*.

El serotipo más prevalente fue el O4 (20.6% [50/243]), seguido del O1 (15.6% [38/243]), O6 (15.6% [38/243]) y O11 (15.2% [37/243]) (**Tabla 22**). Los serotipos O4 y O11 se encontraron con mayor frecuencia en los aislamientos con fenotipo MDR (88.0% [44/50] y 78.4% [29/37], respectivamente), estando presentes en todas las cepas pertenecientes al clon de alto riesgo ST175 (100% [43/43], serotipo O4) y en la mayoría de las cepas ST235 (87.9% [29/33], serotipo O11). Las cuatro (12.1%) cepas ST235 restantes mostraron el serotipo O1. Las cepas con genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻ presentaron con frecuencia el serotipo O11 (66.0% [33/50]) y O1 (14.0% [7/50]), mientras que las cepas pertenecientes al genotipo *exoU*⁻/*exoS*⁺ se asociaron a los serotipos O4 (25.9% [50/193]) y O6 (18.7% [36/193]).

Tabla 22. Distribución de los serotipos del antígeno O en aislamientos de *P. aeruginosa*.

Serotipo (n [%])	Total (n=243)	MDR (n=93)	No MDR (n=150)	P
O1	38 (15.6)	8 (8.6)	30 (20.0)	0.028
O2	6 (2.5)	1 (1.1)	5 (3.3)	0.411
O3	17 (6.9)	2 (2.2)	15 (10.0)	0.020
O4	50 (20.6)	44 (47.3)	6 (4.0)	<0.001
O5	9 (3.7)	1 (1.1)	8 (5.3)	0.159
O6	38 (15.6)	6 (6.5)	32 (24.0)	0.004
O7	5 (2.1)	0 (0)	5 (3.3)	--
O8	3 (1.2)	0 (0)	3 (2.0)	--
O9	2 (0.8)	0 (0)	2 (1.3)	--
O10	4 (1.6)	1 (1.1)	3 (2.0)	1.000
O11	37 (15.2)	29 (31.2)	8 (5.3)	<0.001
O12	1 (0.4)	0 (0)	1 (0.7)	--
O13	0 (0)	0 (0)	0 (0)	--
O14	0 (0)	0 (0)	0 (0)	--
O15	2 (0.8)	0 (0)	2 (1.3)	--
O16	1 (0.4)	0 (0)	1 (0.7)	--
No tipables	30 (12.3)	1 (1.1)	29 (19.3)	<0.001

MDR: multirresistente.

2.7. Tiempo de positividad del hemocultivo

La mediana del TP del hemocultivo de los aislamientos de *P. aeruginosa* fue de 16 (12-19) horas. El 92.6% (225/243) y el 98.8% (240/243) de los aislamientos mostraron un TP menor o igual a 24 y 36 horas, respectivamente. El 31.1% (70/243) de los hemocultivos positivos se detectó en las primeras 12 horas. No se detectó ningún TP del hemocultivo por encima de las 48 horas. La frecuencia de distribución del TP de los hemocultivos se muestra en la **Figura 24**.

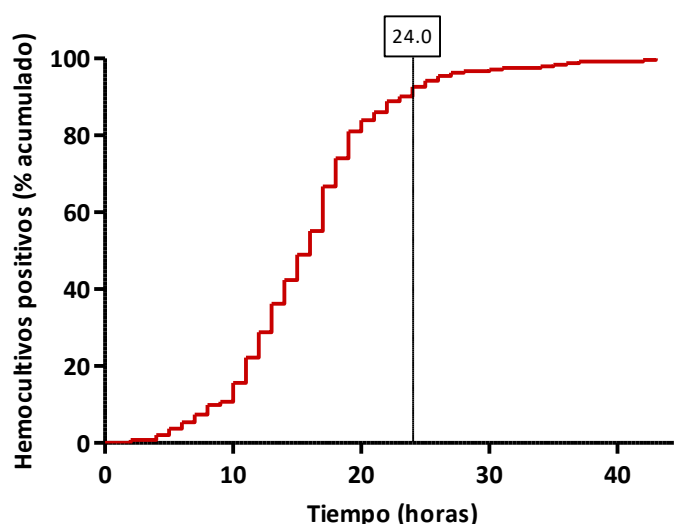


Figura 24. Distribución del tiempo de positividad de los hemocultivos de *P. aeruginosa*.

Se observó una tendencia hacia un menor TP del hemocultivo entre los episodios de bacteriemia de origen respiratorio (15 [11-17] versus 16 [12-19], $P=0.065$) y aquellos con debut en forma de shock séptico (15 [11-19] versus 16 [12-19], $P=0.128$). En contraposición, la mediana del TP de los pacientes que habían recibido tratamiento antibiótico previo fue mayor que en el resto (17 [13-19] versus 15 [11-18], $P=0.177$). Dentro de los episodios MDR, la mayoría (92.5% [86/93]) fueron positivos en las primeras 24 horas. Todos los episodios MDR fueron positivos dentro de las primeras 36 horas. No se encontraron diferencias significativas entre el TP del hemocultivo de los aislamientos MDR y no MDR (16 [12-19] versus 15 [12-18], $P=0.553$). Sin embargo, dentro de las cepas MDR, aquellas pertenecientes al clon de alto riesgo ST235 mostraron un TP significativamente más largo que las cepas ST175 (19 [14-20] versus 14 [10-17], $P=0.005$). También, se observó una tendencia hacia un mayor TP del hemocultivo entre los episodios producidos por cepas con genotipo *exoU*⁺ (17 [14-19] versus 15 [12-18], $P=0.077$). No hubo diferencias significativas en el TP de los episodios producidos por aislamientos O11 en comparación con el resto de serotipos (17 [13-19] versus 16 [12-18], $P=0.376$).

3. Impacto clínico de la multirresistencia de *P. aeruginosa*

3.1. Impacto global del fenotipo MDR

La cohorte global (n=243) fue estratificada, según el fenotipo de resistencia de las cepas de *P. aeruginosa*, en una primera cohorte de episodios producidos por cepas MDR, constituida por el 38.3% de los pacientes incluidos (n=93), y una segunda cohorte de episodios producidos por cepas no MDR, que estuvo constituida por el 61.7% restante (n=150). Las características basales de los pacientes en función del fenotipo de resistencia son mostradas en la **Tabla 23**.

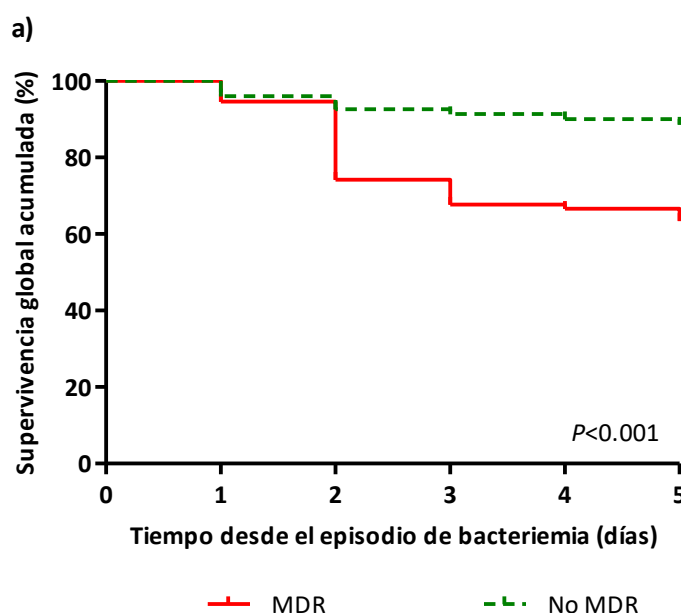
Tabla 23. Comparación de los episodios de bacteriemia en función del fenotipo de resistencia.

Variable ^a	MDR (n=93)	No MDR (n=150)	P
Edad, años (mediana [RIQ])	63.0 (55.0-73.0)	67.0 (55.0-78.0)	0.079
Género masculino (n [%])	56 (60.2)	105 (70.0)	0.153
Comorbilidades (n [%])			
Índice de comorbilidad de Charlson (mediana [RIQ])	2 (2-4)	2 (1-3)	0.513
Diabetes mellitus	31 (33.3)	32 (21.3)	0.054
Enfermedad renal crónica	12 (12.9)	29 (19.3)	0.261
Neoplasia sólida	19 (20.4)	31 (20.7)	0.965
Neoplasia hematológica	31 (33.3)	31 (20.7)	0.040
Neutropenia severa (<500 células/mm ³)	30 (32.3)	28 (18.7)	0.024
Trasplante	19 (20.4)	33 (22.0)	0.897
Colonización previa por PA MDR (n [%])	31 (33.3)	3 (2.0)	<0.001
Ingreso previo en UCI (n [%])	17 (18.3)	27 (18.0)	0.956
Procedimientos invasivos previos (n [%])			
Catéter vascular	70 (75.3)	76 (50.7)	<0.001
Catéter urinario	41 (44.1)	66 (44.0)	0.989
Ventilación mecánica	17 (18.3)	19 (12.7)	0.312
Cirugía previa (n [%])	37 (39.8)	44 (29.3)	0.124
Tratamiento antibiótico previo (n [%])	82 (88.2)	88 (58.7)	<0.001
Carbapenémicos	36 (38.7)	18 (12.0)	<0.001
Fluoroquinolonas	29 (31.2)	23 (15.3)	0.006
Servicio de ingreso (n [%])			
Médico	29 (31.2)	91 (60.7)	<0.001
Onco-hematología	28 (30.1)	23 (15.3)	0.009
Quirúrgico	14 (15.1)	15 (10.0)	0.328
UCI	22 (23.7)	21 (14.0)	0.081

Adquisición (n [%])			
Nosocomial	71 (76.3)	66 (44.0)	<0.001
Asociada al cuidado sanitario	22 (23.7)	60 (40.0)	0.013
Comunitaria	0 (0)	24 (16.0)	<0.001
Foco de la bacteriemia (n [%])			
Alto riesgo	67 (72.0)	83 (55.3)	0.014
Desconocido	8 (8.6)	18 (12.0)	0.536
Respiratorio	33 (35.5)	22 (14.7)	<0.001
Abdominal	21 (22.6)	29 (19.3)	0.656
Piel y partes blandas	5 (5.4)	14 (9.3)	0.330
Bajo riesgo	26 (27.9)	67 (44.7)	0.014
Urinario	18 (19.4)	49 (32.7)	0.035
Catéter vascular	7 (7.5)	16 (10.7)	0.557
Otros	1 (1.1)	2 (1.3)	1.000
Presentación clínica (n [%])			
Pitt score ≥ 2	60 (64.5)	75 (50.0)	0.038
Shock séptico	32 (34.4)	34 (22.7)	0.064
Antibioterapia empírica inadecuada (n [%])	55 (59.1)	30 (20.0)	<0.001
Mortalidad (n [%])			
Mortalidad global temprana (mortalidad a 5 días)	32 (34.4)	17 (11.3)	<0.001
Mortalidad global tardía (mortalidad a 30 días)	49 (52.7)	32 (21.3)	<0.001
Tipo de carbapenemasa (n [%])			
VIM-2/ST175	43 (46.2)	0 (0)	<0.001
GES-5/ST235	33 (35.5)	0 (0)	<0.001
Genotipo del SST3 (n [%])			
<i>exoU</i> ⁺ / <i>exoS</i> ⁻	33 (35.5)	17 (11.3)	<0.001
<i>exoU</i> ⁺ / <i>exoS</i> ⁺	59 (63.4)	126 (84.0)	<0.001
<i>exoU</i> ⁻ / <i>exoS</i> ⁻	1 (1.1)	7 (4.7)	0.001
Serotipo del antígeno O (n [%])			
O1	8 (8.6)	30 (20.0)	0.028
O4	44 (47.3)	6 (4.0)	<0.001
O6	6 (6.5)	32 (21.3)	<0.001
O11	29 (31.2)	8 (5.3)	<0.001
Otro	6 (6.5)	74 (49.3)	<0.001
TP del hemocultivo, horas (mediana [RIQ])	16.0 (12.0-19.0)	15.0 (12.0-18.0)	0.553

^aSe representan las variables más importantes. PA: *Pseudomonas aeruginosa*; MDR: multirresistente; UCI: Unidad de Cuidados Intensivos; SST3: sistema de secreción tipo 3; TP: tiempo hasta positividad; RIQ: rango intercuartílico.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las características demográficas entre los dos grupos. Los factores que mostraron una mayor probabilidad de aislamiento de cepas MDR fueron la colonización previa por *P. aeruginosa* MDR (33.3% versus 2.0%, $P<0.001$), el uso reciente de catéteres vasculares (75.3% versus 50.7%, $P<0.001$), y la administración previa de carbapenémicos (38.7% versus 12.0%, $P<0.001$) y fluoroquinolonas (31.2% versus 15.3%, $P=0.006$). Los episodios de bacteriemia causados por cepas de *P. aeruginosa* MDR se asociaron a una mayor proporción de infecciones de origen respiratorio (35.5% versus 14.7%, $P<0.001$), con una puntuación en el índice de Pitt más elevada (2 [1-3] versus 2 [0-3], $P=0.069$) y una mayor presentación en forma de shock séptico (34.4% versus 22.7%, $P=0.064$), en comparación con los episodios producidos por cepas sensibles. También se observó que la inadecuación del tratamiento antibiótico empírico fue significativamente mayor en pacientes con infecciones por *P. aeruginosa* MDR en comparación con las producidas por cepas sensibles (59.1% versus 20.0%, $P<0.001$). Además, la presencia del fenotipo MDR determinó diferencias significativas tanto en la mortalidad global temprana (34.4% versus 11.3%, $P<0.001$) como en la mortalidad global tardía (52.7% versus 21.3%, $P<0.001$). La curva de supervivencia mostró diferencias significativas en la probabilidad acumulada de muerte a los 5 días entre los episodios producidos por cepas MDR y no MDR, con probabilidades de supervivencia no ajustadas del 63.4% en el grupo de pacientes MDR, y del 88.6% en el grupo no MDR (log-rank, $P<0.001$) (**Figura 25a**). De igual modo, la supervivencia acumulada hasta el día 30 fue significativamente diferente entre los episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa* MDR y no MDR. Las probabilidades de supervivencia no ajustadas hasta el día 30 fueron del 45.2% en el grupo de pacientes MDR y del 80.0% en el grupo no MDR (log-rank, $P<0.001$) (**Figura 25b**).



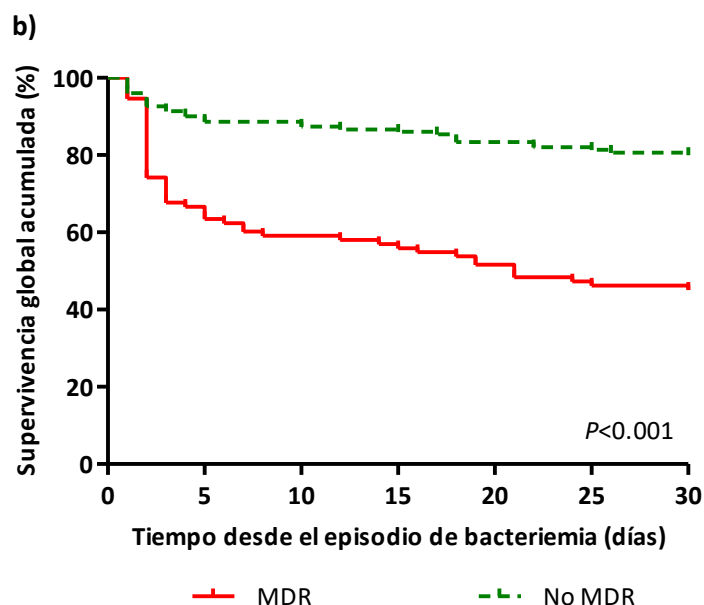


Figura 25. Comparación de las curvas Kaplan-Meier de supervivencia global acumulada a 5 días (a) y a 30 días (b) tras el episodio de bacteriemia en función del fenotipo de resistencia.

3.2. Impacto global de los clones de alto riesgo ST175 y ST235

Sin embargo, dentro de las cepas MDR, el comportamiento clínico de los principales clones de alto riesgo ST175 (46.2% [43/93]) y ST235 (35.5% [33/93]) fue diferente. Los episodios de bacteriemia causados por cepas de *P. aeruginosa* MDR pertenecientes al clon de alto riesgo ST235 se asociaron a una peor presentación clínica con una puntuación en el índice de Pitt más elevada (2 [2-3] versus 2 [1-3], $P=0.064$) y mayor presentación en forma de shock séptico (54.5% versus 23.3%, $P=0.010$). Así mismo, la presencia del clon de alto riesgo ST235 determinó una tendencia hacia un incremento en la mortalidad global tardía (69.7% versus 48.8%, $P=0.111$), en comparación con el clon de alto riesgo ST175 (Tabla 24).

Tabla 24. Comparación de los episodios de bacteriemia en función de los clones de alto riesgo.

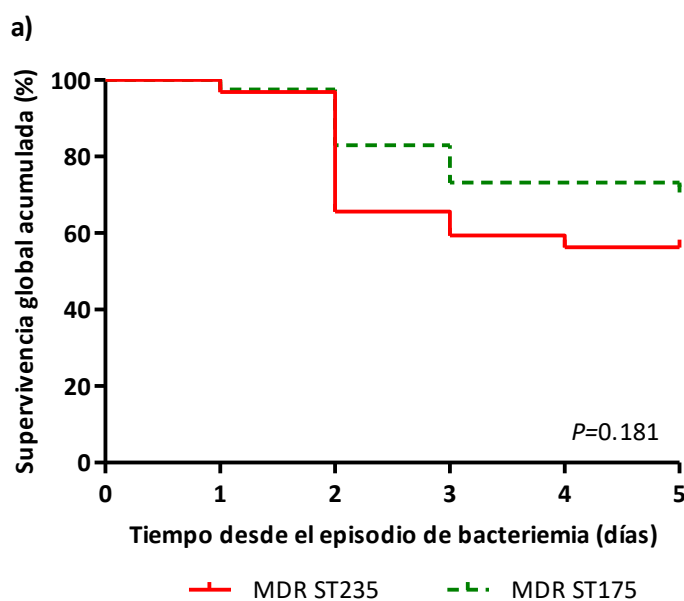
Variable ^a	MDR ST175 (n=43)	MDR ST235 (n=33)	P
Edad, años (mediana [RIQ])	59.0 (52.0-72.7)	62.0 (50.5-71.3)	0.699
Género masculino (n [%])	24 (55.8)	22 (66.7)	0.469
Comorbilidades (n [%])			
Índice de comorbilidad de Charlson (mediana [RIQ])	2 (2-4)	2 (1-3)	0.077
Diabetes mellitus	10 (23.3)	14 (42.4)	0.125
Enfermedad renal crónica	6 (13.9)	3 (9.0)	0.723
Neoplasia sólida	10 (23.3)	7 (21.2)	0.832

Neoplasia hematológica	21 (48.8)	8 (24.2)	0.051
Neutropenia severa (<500 células/mm ³)	18 (41.9)	10 (30.3)	0.426
Trasplante	8 (18.6)	5 (15.2)	0.929
Colonización previa por PA MDR (n [%])			
Ingreso previo en UCI (n [%])	6 (13.9)	8 (24.2)	0.396
Procedimientos invasivos previos (n [%])			
Catéter vascular	34 (79.1)	27 (81.8)	0.993
Catéter urinario	18 (41.9)	16 (48.5)	0.731
Ventilación mecánica	6 (13.9)	7 (21.2)	0.599
Cirugía previa (n [%])	12 (27.9)	15 (45.5)	0.179
Tratamiento antibiótico previo (n [%])	40 (93.0)	29 (87.9)	0.459
Carbapenémicos	12 (27.9)	18 (54.5)	0.034
Fluoroquinolonas	19 (44.2)	6 (18.2)	0.031
Adquisición (n [%])			
Nosocomial	37 (86.0)	23 (69.7)	0.147
Asociada al cuidado sanitario	6 (13.9)	10 (30.3)	0.147
Comunitaria	0 (0)	0 (0)	---
Foco de la bacteriemia (n [%])			
Alto riesgo	29 (67.4)	25 (75.8)	0.591
Desconocido	5 (11.6)	2 (6.0)	0.692
Respiratorio	15 (34.9)	14 (42.4)	0.665
Abdominal	8 (18.6)	6 (18.2)	0.962
Piel y partes blandas	1 (2.3)	3 (7.8)	0.310
Bajo riesgo	14 (32.6)	8 (24.2)	0.591
Urinario	9 (20.9)	6 (18.2)	0.993
Catéter vascular	4 (9.3)	2 (6.0)	0.962
Otros	1 (2.3)	0 (0)	---
Presentación clínica (n [%])			
Pitt score ≥2	24 (55.8)	26 (78.8)	0.064
Shock séptico	10 (23.3)	18 (54.5)	0.010
Antibioterapia empírica inadecuada (n [%])	23 (53.5)	22 (66.7)	0.355
Mortalidad (n [%])			
Mortalidad global temprana (mortalidad a 5 días)	14 (32.6)	15 (45.5)	0.363
Mortalidad global tardía (mortalidad a 30 días)	21 (48.8)	23 (69.7)	0.111
Tipo de carbapenemasa (n [%])			
VIM-2/ST175	43 (100)	0 (0)	<0.001
GES-5/ST235	0 (0)	33 (100)	<0.001

Genotipo del SST3 (n [%])			
<i>exoU</i> ⁺ / <i>exoS</i> ⁻	0 (0)	33 (100)	<0.001
<i>exoU</i> / <i>exoS</i> ⁺	43 (100)	0 (0)	<0.001
<i>exoU</i> / <i>exoS</i> ⁻	0 (0)	0 (0)	---
Serotipo del antígeno O (n [%])			
O1	0 (0)	4 (12.1)	---
O4	43 (100)	0 (0)	<0.001
O6	0 (0)	0 (0)	---
O11	0 (0)	29 (87.9)	<0.001
Otro	0 (0)	0 (0)	---
TP del hemocultivo, horas (mediana [RIQ])	14.0 (10.3-17.0)	19.0 (14.0-20.0)	0.005

^aSe representan las variables más importantes. ST: secuencia tipo; MDR: multirresistente; UCI: Unidad de Cuidados Intensivos; SST3: sistema de secreción tipo 3; TP: tiempo hasta positividad; RIQ: rango intercuartílico.

La curva de supervivencia no mostró diferencias significativas en la probabilidad acumulada de muerte a los 5 días entre los episodios producidos por cepas pertenecientes a los clones de alto riesgo ST235 y ST175, con probabilidades de supervivencia no ajustadas del 56.3% en el grupo de pacientes ST235, y del 70.7% en el grupo ST175 (log-rank, $P=0.181$) (**Figura 26a**). Sin embargo, la supervivencia acumulada hasta el día 30 fue significativamente diferente entre los episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa* pertenecientes a los clones de alto riesgo ST235 y ST175. Las probabilidades de supervivencia no ajustadas hasta el día 30 fueron del 31.3% en el grupo de pacientes ST235 y del 53.7% en el grupo ST175 (log-rank, $P=0.050$) (**Figura 26b**).



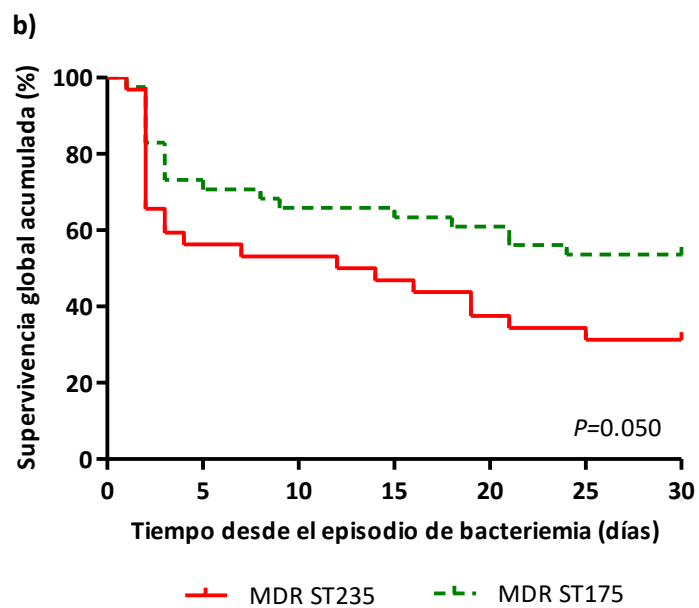


Figura 26. Comparación de las curvas Kaplan-Meier de supervivencia global acumulada a 5 días (**a**) y a 30 días (**b**) tras el episodio de bacteriemia en función de los clones multirresistentes de alto riesgo.

4. Impacto clínico de la virulencia de *P. aeruginosa*

4.1. Impacto global del genotipo *exoU*⁺

La cohorte global (n=243) fue estratificada, según el genotipo *exoU* de las cepas de *P. aeruginosa*, en una primera cohorte de episodios producidos por cepas *exoU*⁺, constituida por el 20.6% de los pacientes incluidos (n=50), y una segunda cohorte de episodios producidos por cepas *exoU*⁻, que estuvo constituida por el 79.4% restante (n=193). Las características basales de los pacientes en función del genotipo *exoU* son mostradas en la **Tabla 25**.

Tabla 25. Comparación de los episodios de bacteriemia en función del genotipo *exoU*.

Variable ^a	<i>exoU</i> ⁺ (n=50)	<i>exoU</i> ⁻ (n=193)	P
Edad, años (mediana [RIQ])	64.0 (57.0-74.0)	66.0 (55.0-77.0)	0.731
Género masculino (n [%])	35 (70.0)	126 (65.3)	0.645
Comorbilidades (n [%])			
Índice de comorbilidad de Charlson (mediana [RIQ])	2 (1-4)	2 (2-3)	0.699
Diabetes mellitus	21 (42.0)	42 (21.8)	0.006
Enfermedad renal crónica	8 (16.0)	33 (17.1)	0.853
Neoplasia sólida	10 (20.0)	40 (20.7)	0.910
Neoplasia hematológica	12 (24.0)	50 (25.9)	0.925
Neutropenia severa (<500 células/mm ³)	13 (26.0)	45 (23.3)	0.833
Trasplante	8 (16.0)	44 (22.8)	0.395
Ingreso previo en UCI (n [%])	12 (24.0)	32 (16.6)	0.313
Procedimientos invasivos previos (n [%])			
Catéter vascular	37 (74.0)	109 (56.5)	0.036
Catéter urinario	25 (50.0)	82 (42.5)	0.427
Ventilación mecánica	10 (20.0)	26 (13.5)	0.349
Cirugía previa (n [%])	21 (42.0)	60 (31.1)	0.197
Adquisición (n [%])			
Nosocomial	31 (62.0)	106 (54.9)	0.459
Asociada al cuidado sanitario	18 (36.0)	64 (33.2)	0.833
Comunitaria	1 (2.0)	23 (11.9)	0.034
Foco de la bacteriemia (n [%])			
Alto riesgo	36 (72.0)	114 (59.1)	0.130
Desconocido	5 (10.0)	21 (10.9)	1.000
Respiratorio	18 (36.0)	37 (19.2)	0.019
Abdominal	9 (18.0)	41 (21.2)	0.757

Piel y partes blandas	4 (8.0)	15 (7.8)	1.000
Bajo riesgo	14 (28.0)	79 (40.9)	0.130
Urinario	12 (24.0)	55 (28.5)	0.648
Catéter vascular	2 (4.0)	21 (10.9)	0.180
Otros	0 (0)	3 (1.6)	1.000
Presentación clínica (n [%])			
Pitt score ≥ 2	37 (74.0)	98 (50.8)	0.005
Shock séptico	26 (52.0)	40 (20.7)	<0.001
Mortalidad (n [%])			
Mortalidad global temprana (mortalidad a 5 días)	20 (40.0)	29 (15.0)	<0.001
Mortalidad global tardía (mortalidad a 30 días)	30 (60.0)	51 (26.4)	<0.001
Fenotipo de resistencia (n [%])			
No MDR	17 (34.0)	133 (68.9)	<0.001
MultiS	4 (8.0)	19 (9.8)	1.000
ModR	13 (26.0)	114 (59.1)	<0.001
MDR	33 (66.0)	60 (31.1)	<0.001
No XDR	0 (0)	6 (3.1)	0.351
XDR	33 (66.0)	54 (27.9)	<0.001
Tipo de carbapenemasa (n [%])			
VIM-2/ST175	0 (0)	43 (22.3)	<0.001
GES-5/ST235	33 (66.0)	0 (0)	<0.001
Serotipo del antígeno O (n [%])			
O1	7 (14.0)	31 (16.1)	0.889
O4	0 (0)	50 (25.9)	<0.001
O6	2 (4.0)	36 (18.7)	0.009
O11	33 (66.0)	4 (2.1)	<0.001
Otro	8 (16.0)	72 (37.3)	0.007
TP del hemocultivo, horas (mediana [RIQ])	17.0 (14.0-19.0)	15.0 (12.0-18.0)	0.077

^aSe representan las variables más importantes. MDR: multiresistente; XDR: extremadamente resistente; UCI: Unidad de Cuidados Intensivos; SST3: sistema de secreción tipo 3; TP: tiempo hasta positividad; RIQ: rango intercuartílico.

Los episodios de bacteriemia causados por cepas de *P. aeruginosa* pertenecientes al genotipo *exoU*⁺ se asociaron con una mayor proporción de infecciones respiratorias (36.0% versus 19.2%, $P=0.019$), con una puntuación en el índice de Pitt más elevada (3 [1-4] versus 2 [0-3], $P=0.035$) y shock séptico (52.0% versus 20.7%, $P<0.001$), en comparación con los episodios producidos por cepas pertenecientes al genotipo *exoU*⁻. Además, el genotipo *exoU*⁺ determinó diferencias significativas tanto en la mortalidad global temprana (40.0% versus 15.0%, $P<0.001$) como en la mortalidad global tardía (60.0% versus 26.4%, $P<0.001$).

La curva de supervivencia mostró diferencias significativas en la probabilidad acumulada de muerte a los 5 días entre los episodios producidos por cepas *exoU*⁺ y *exoU*⁻, con probabilidades de supervivencia no ajustadas del 54.9% en el grupo de pacientes *exoU*⁺, y del 85.4% en el grupo *exoU*⁻ (log-rank, $P<0.001$) (**Figura 27a**). De igual modo, la supervivencia acumulada hasta el día 30 fue significativamente diferente entre los episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa* con genotipo *exoU*⁺ y *exoU*⁻. Las probabilidades de supervivencia no ajustadas hasta el día 30 fueron del 35.3% en el grupo de pacientes *exoU*⁺ y del 75.0% en el grupo *exoU*⁻ (log-rank, $P<0.001$) (**Figura 27b**). Debido a que los genotipos *exoT* y *exoY* fueron positivos en la mayoría de las cepas, estos genes no se incluyeron en los análisis.

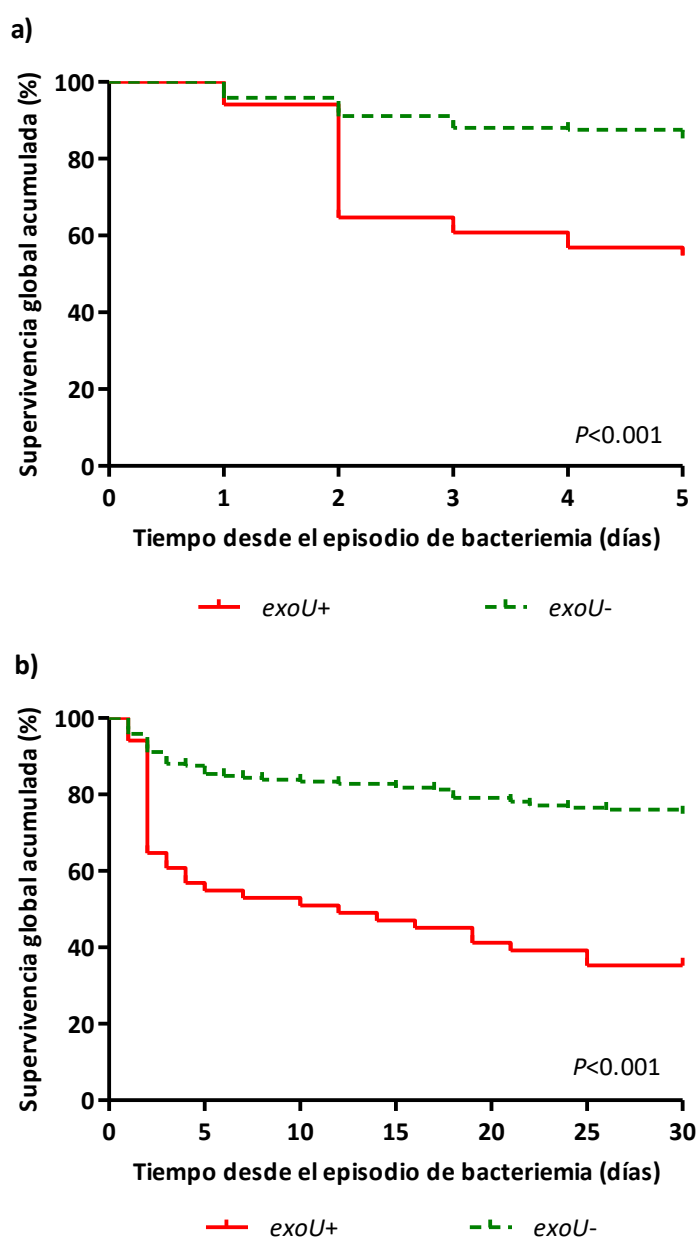


Figura 27. Comparación de las curvas Kaplan-Meier de supervivencia global acumulada a 5 días (**a**) y a 30 días (**b**) tras el episodio de bacteriemia en función del genotipo *exoU*.

4.2. Impacto global del serotipo O11

La cohorte global (n=243) fue estratificada, según el serotipo del antígeno O de las cepas de *P. aeruginosa*, en una primera cohorte de episodios producidos por cepas O11, constituida por el 15.2% de los pacientes incluidos (n=37), y una segunda cohorte de episodios producidos por cepas no O11, que estuvo constituida por el 84.4% restante (n=206). Las características basales de los pacientes en función del serotipo O11 son mostradas en la **Tabla 26**.

Tabla 26. Comparación de los episodios de bacteriemia en función del serotipo O11.

Variable ^a	O11 (n=37)	No O11 (n=206)	P
Edad, años (mediana [RIQ])	62.0 (50.5-73.8)	66.0 (56.0-77.0)	0.276
Género masculino (n [%])	25 (67.6)	136 (66.0)	0.854
Comorbilidades (n [%])			
Índice de comorbilidad de Charlson (mediana [RIQ])	2 (1-3)	2 (2-3)	0.344
Diabetes mellitus	15 (40.5)	48 (23.3)	0.046
Enfermedad renal crónica	5 (13.5)	36 (17.5)	0.723
Neoplasia sólida	7 (18.9)	43 (20.9)	0.960
Neoplasia hematológica	9 (24.3)	53 (25.7)	0.856
Neutropenia severa (<500 células/mm ³)	12 (32.4)	46 (22.3)	0.263
Trasplante	6 (16.2)	46 (22.3)	0.537
Colonización previa por PA MDR (n [%])	12 (32.4)	22 (10.7)	0.001
Ingreso previo en UCI (n [%])	9 (24.3)	35(17.0)	0.403
Procedimientos invasivos previos (n [%])			
Catéter vascular	28 (75.7)	118 (57.3)	0.054
Catéter urinario	19 (51.4)	88 (42.7)	0.371
Ventilación mecánica	8 (21.6)	28 (13.6)	0.310
Cirugía previa (n [%])	16 (43.2)	65 (31.6)	0.230
Tratamiento antibiótico previo (n [%])	29 (78.4)	141 (68.4)	0.308
Adquisición (n [%])			
Nosocomial	25 (67.6)	112 (54.4)	0.190
Asociada al cuidado sanitario	11 (29.7)	71 (34.5)	0.709
Comunitaria	1 (2.7)	23 (11.2)	0.141
Foco de la bacteriemia (n [%])			
Alto riesgo	29 (78.4)	121 (58.7)	0.037
Desconocido	3 (8.1)	23 (11.2)	0.775
Respiratorio	14 (37.8)	41 (19.9)	0.028

Abdominal	8 (21.6)	42 (20.4)	0.864
Piel y partes blandas	4 (10.8)	15 (7.3)	0.503
Bajo riesgo	8 (21.6)	85 (41.3)	0.037
Urinario	7 (18.9)	60 (29.1)	0.280
Catéter vascular	1 (2.7)	22 (10.7)	0.222
Otros	0 (0)	3 (1.5)	---
Presentación clínica (n [%])			
Pitt score ≥ 2	31 (83.8)	104 (50.5)	<0.001
Shock séptico	20 (54.1)	46 (22.3)	<0.001
Mortalidad (n [%])			
Mortalidad global temprana (mortalidad a 5 días)	18 (48.6)	31 (15.0)	<0.001
Mortalidad global tardía (mortalidad a 30 días)	25 (67.6)	56 (27.2)	<0.001
Fenotipo de resistencia (n [%])			
No MDR	8 (21.6)	142 (68.9)	<0.001
MultiS	2 (5.4)	21 (10.2)	0.544
ModR	6 (16.2)	121 (58.7)	<0.001
MDR	29 (78.4)	64 (31.1)	<0.001
No XDR	0 (0)	6 (2.9)	---
XDR	29 (78.4)	58 (28.2)	<0.001
Tipo de carbapenemasa (n [%])			
VIM-2/ST175	0 (0)	43 (20.9)	0.001
GES-5/ST235	29 (78.4)	4 (1.9)	<0.001
Genotipo del SST3			
<i>exoU</i> ⁺ / <i>exoS</i> ⁻	33 (89.2)	17 (8.3)	<0.001
<i>exoU</i> ⁻ / <i>exoS</i> ⁺	4 (10.8)	181 (87.9)	<0.001
<i>exoU</i> ⁻ / <i>exoS</i> ⁻	0 (0)	8 (3.9)	---
TP del hemocultivo, horas (mediana [RIQ])	17.0 (12.8-19.0)	16.0 (12.0-18.0)	0.376

^aSe representan las variables más importantes. MDR: multirresistente; XDR: extremadamente resistente; UCI: Unidad de Cuidados Intensivos; SST3: sistema de secreción tipo 3; TP: tiempo hasta positividad; RIQ: rango intercuartílico.

Los episodios de bacteriemia causados por cepas de *P. aeruginosa* pertenecientes al serotipo O11 se asociaron con una mayor proporción de infecciones respiratorias (37.8% versus 19.9%, $P=0.028$), con una puntuación en el índice de Pitt más elevada (3 [2-3] versus 2 [0-3], $P=0.012$) y mayor presentación en forma de shock séptico (54.1% versus 22.3%, $P<0.001$), en comparación con los episodios producidos por cepas pertenecientes a otros serotipos del antígeno O. Asimismo, la presencia del serotipo O11 determinó diferencias significativas tanto en la mortalidad global temprana (48.6% versus 15.0%, $P<0.001$) como en la mortalidad global tardía (67.6% versus 27.2%, $P<0.001$).

La curva de supervivencia mostró diferencias significativas en la probabilidad acumulada de muerte a los 5 días entre los episodios producidos por cepas pertenecientes al serotipo O11 y no O11, con probabilidades de supervivencia no ajustadas del 35.3% en el grupo de pacientes con serotipo O11, y del 75.0% en el grupo serotipo de pacientes con serotipo no O11 (log-rank, $P<0.001$) (**Figura 28a**). De igual modo, la supervivencia acumulada hasta el día 30 fue significativamente diferente entre los episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa* con serotipo O11 y no O11. Las probabilidades de supervivencia no ajustadas hasta el día 30 fueron del 26.3% en el grupo de pacientes con serotipo O11 y del 74.1% en el grupo de pacientes con serotipo no O11 (log-rank, $P<0.001$) (**Figura 28b**).

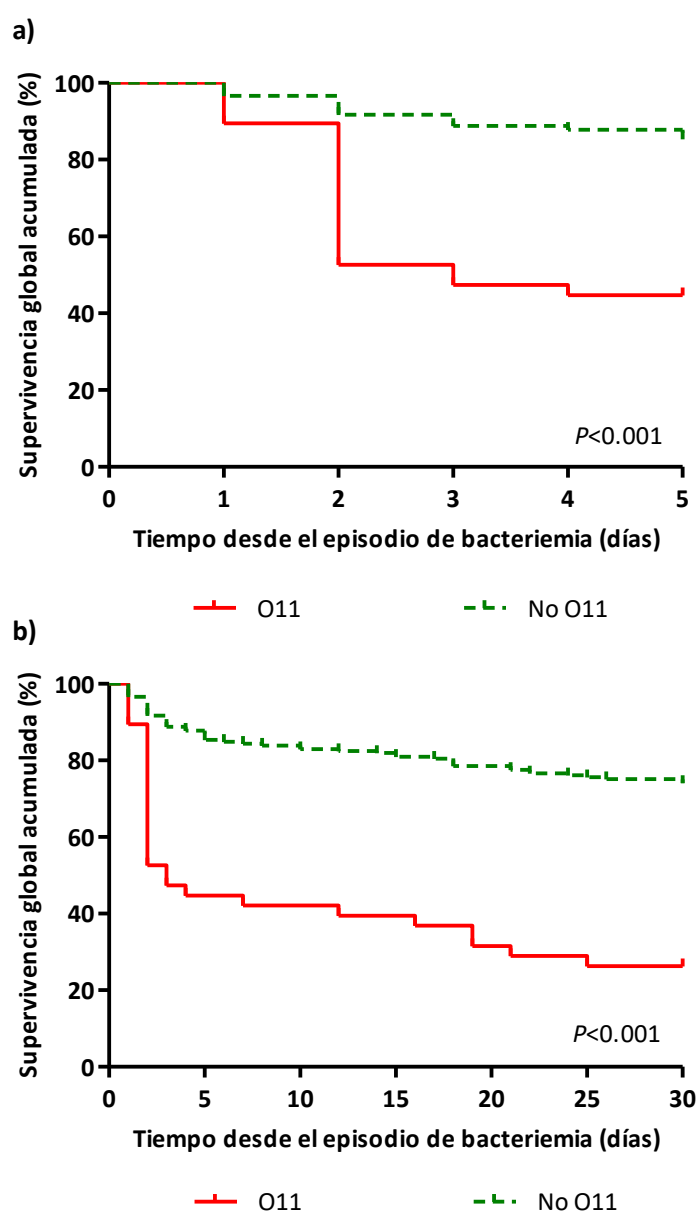


Figura 28. Comparación de las curvas Kaplan-Meier de supervivencia global acumulada a 5 días (**a**) y a 30 días (**b**) tras el episodio de bacteriemia en función del serotipo O11.

4.3. Asociación entre la multirresistencia y la virulencia

A continuación, se analizó la asociación entre el serotipo del antígeno O, el perfil de resistencia, incluyendo los clones epidémicos de alto riesgo, y el genotipo del SST3. Como se muestra en la **Figura 29**, se observó que los serotipos O4 y O11 se asociaron con mayor frecuencia al fenotipo MDR (88.0% versus 25.4%, $P<0.001$ y 78.4% versus 31.1%, $P<0.001$, respectivamente), en comparación con otros serotipos. De hecho, dentro del fenotipo MDR, se observó una asociación significativa entre los serotipos O4 y O11 y el fenotipo XDR (86.0% versus 22.8%, $P<0.001$ y 78.4% versus 28.2%, $P<0.001$, respectivamente). Asimismo, dentro del fenotipo XDR, se documentó la presencia del serotipo O4 en todas las cepas pertenecientes al clon de alto riesgo ST175/VIM-2 (100% [43/43]), mientras que el serotipo O11 estuvo presente en la mayoría de las cepas pertenecientes al clon de alto riesgo ST235/GES-5 (87.9% [29/33]). De forma paralela, el serotipo O11 se asoció con mayor frecuencia al genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻ que otros serotipos del antígeno O (89.2% versus 8.3%, $P<0.001$). Por el contrario, los serotipos O4 y O6 se asociaron principalmente con el genotipo *exoU*⁻/*exoS*⁺, en comparación con otros serotipos del antígeno O (100% versus 70.0%, $P<0.001$ y 94.7% versus 72.5%, $P=0.002$, respectivamente). En resumen, el serotipo O4 se asoció fuertemente con el fenotipo XDR (clon de alto riesgo ST175/VIM-2) y el genotipo *exoU*⁻/*exoS*⁺, mientras que el serotipo O11 se relacionó positivamente con el fenotipo XDR (clon de alto riesgo ST235/GES-5) y el genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻.

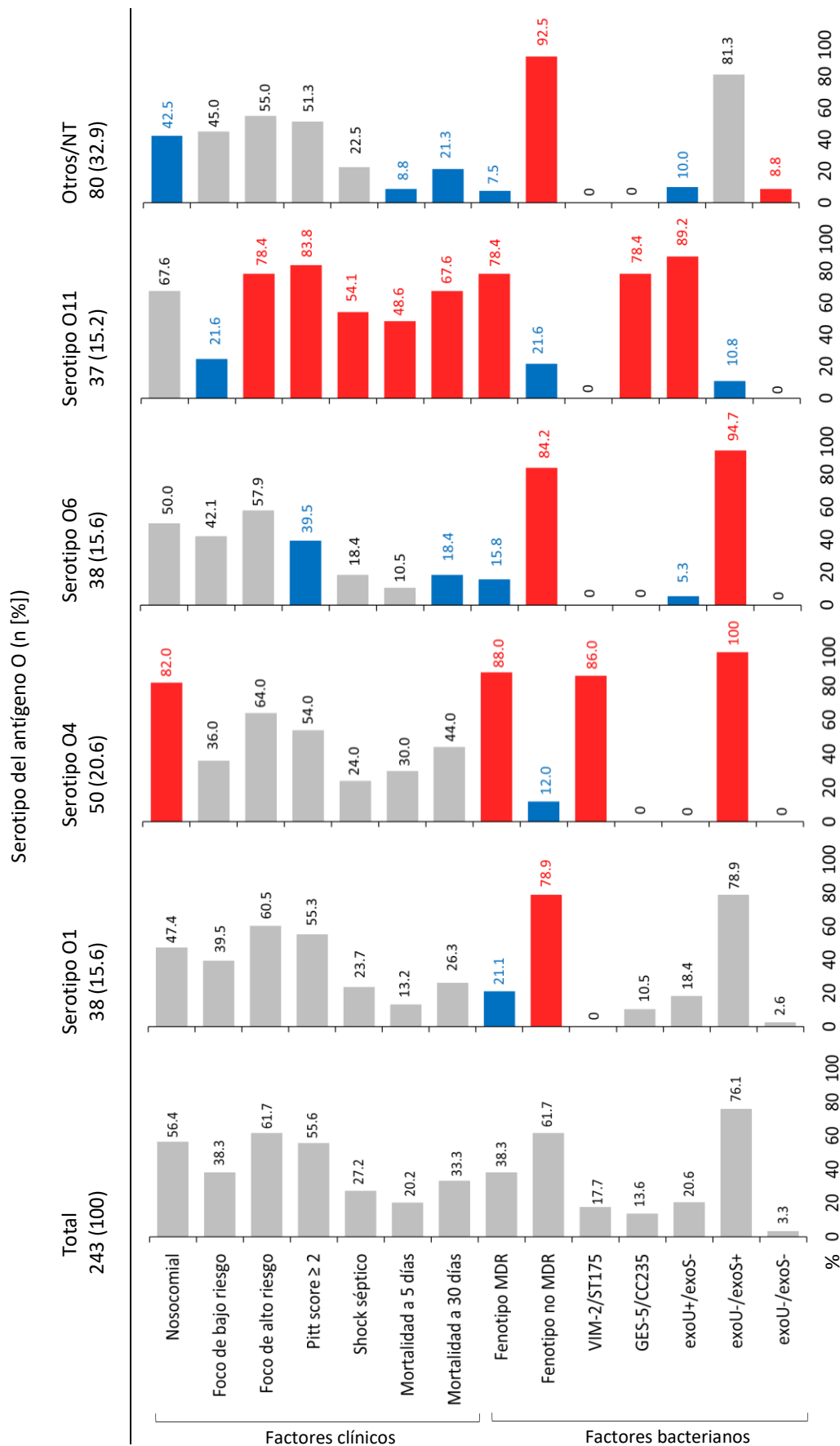


Figura 29. Diversidad de factores clínicos y bacterianos según el serotipo del antígeno O. La proporción de aislamientos para cada variable se indica en el gráfico de barras. La significación estadística ($P < 0.05$) por test de χ^2 está representada por barras y números de colores (rojo, más prevalente; azul, menos prevalente). MDR: multirresistente; NT: no tipable.

5. Mortalidad de la bacteriemia por *P. aeruginosa*

5.1. Evolución de la mortalidad a lo largo del tiempo

Tanto la mortalidad global precoz como la tardía sufrieron variaciones a lo largo de los años, con una tasa mínima del 10.3% y del 29.1%, en 2014 y 2015, respectivamente, y una tasa máxima del 25.0% y del 39.1%, respectivamente en 2016 (**Figura 30**). Las curvas de ambas variables no mostraron una tendencia estadísticamente significativa ($P=0.460$ y $P=0.659$, respectivamente).

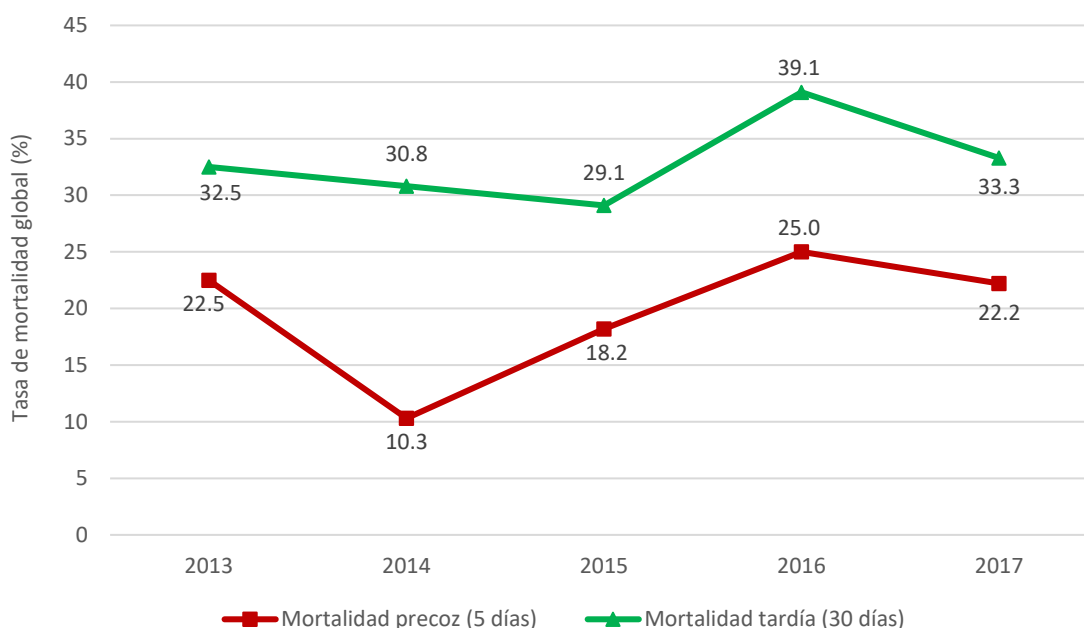


Figura 30. Evolución anual de la mortalidad global precoz y tardía de los episodios de bacteriemia.

5.2. Análisis univariante de la mortalidad precoz y tardía

La mortalidad fue evaluable en 240 (98.8%) episodios. Se descartaron 3 pacientes en los que finalmente se limitaron los esfuerzos terapéuticos debido a su condición basal (tratamiento paliativo) y que, por tanto, fueron desestimados de tratamiento antibiótico activo. Así, hubo 78 (32.5%) pacientes que fallecieron, por cualquier causa, en los primeros 30 días (mortalidad tardía) tras el inicio del episodio de bacteriemia. En 46 (58.9% de fallecidos y 19.2% del total) pacientes la mortalidad tuvo lugar en los primeros 5 días (mortalidad precoz) tras el inicio del episodio de bacteriemia. Dentro de éstos, la mortalidad se concentró en las primeras 48 horas (71.7% [33/46] de las muertes precoces) tras el inicio del episodio de bacteriemia. Los resultados del análisis univariante de la mortalidad global precoz y tardía por regresión logística se resumen en la **Tabla 27**.

Tabla 27. Análisis univariante de factores predictores de mortalidad global precoz y tardía (n=240)^a.

Variable	Mortalidad precoz (5 días)		P	Mortalidad tardía (30 días)		P
	Fallecidos (n=46)	No fallecidos (n=194)		Fallecidos (n=78)	No fallecidos (n=162)	
Edad, años (mediana [RIQ])	66.0 (57.0-77.0)	58.0 (53.0-74.0)	0.059	66.0 (57.0-77.0)	62.0 (53.0-76.0)	0.157
Género masculino (n [%])	28 (60.9)	131 (67.5)	0.493	44 (56.4)	115 (71.0)	0.037
Índice de Charlson (mediana [RIQ])	2 (2-4)	2 (2-3)	0.767	2 (2-3)	2 (1-3)	0.776
Neoplasia hematológica (n [%])	24 (52.2)	37 (19.1)	<0.001	29 (37.2)	32 (19.8)	0.006
Neutropenia severa (<500 células/mm ³) (n [%])	26 (56.5)	32 (16.5)	<0.001	33 (42.3)	25 (15.4)	<0.001
Adquisición nosocomial (n [%])	34 (73.9)	101 (52.1)	0.012	59 (75.6)	76 (46.9)	<0.001
Foco respiratorio (n [%])	29 (63.0)	24 (12.4)	<0.001	35 (44.9)	18 (11.1)	<0.001
Pitt score ≥2 (n [%])	40 (86.9)	92 (47.4)	<0.001	62 (79.5)	70 (43.2)	<0.001
Shock séptico (n [%])	27 (58.7)	37 (19.1)	<0.001	35 (44.9)	29 (17.9)	<0.001
Tratamiento empírico inadecuado (n [%])	22 (47.8)	63 (32.5)	0.074	30 (38.5)	55 (33.9)	0.589
Fenotipo MDR (n [%])	31 (67.4)	61 (31.4)	<0.001	48 (61.5)	44 (27.2)	<0.001
VIM-2/ST175 (n [%])	13 (28.3)	29 (14.9)	0.055	20 (25.6)	22 (13.6)	0.034
GES-5/ST235 (n [%])	15 (32.6)	18 (9.3)	<0.001	23 (29.5)	10 (6.2)	<0.001
Genotipo <i>exoU</i> ⁺ (n [%])	19 (41.3)	30 (15.5)	<0.001	29 (37.2)	20 (12.3)	<0.001
Serotipo O4 (n [%])	14 (30.4)	35 (18.0)	0.095	21 (26.9)	28 (17.3)	0.118
Serotipo O11 (n [%])	18 (39.1)	19 (9.8)	<0.001	25 (32.1)	12 (7.4)	<0.001
TP del hemocultivo, horas (mediana [RIQ])	14.0 (11.0-16.0)	16.0 (12.0-19.0)	0.005	14.0 (11.0-17.0)	17.0 (13.0-19.0)	0.001

MDR: multirresistente; TP: tiempo hasta positividad; RIQ: rango intercuartílico. ^aExcluidos 3 pacientes en los que se limitó el esfuerzo terapéutico (n=240).

La mediana de edad de los pacientes fallecidos por cualquier causa a los 5 días fue de 66 (57-77) años mientras que la de los supervivientes fue de 58 (53-74) años con una cierta tendencia estadística ($P=0.059$). En contraposición, la mediana de edad de los pacientes fallecidos a los 30 días fue de 66 (57-77) años frente a los 62 (53-76) años de los no fallecidos, diferencia estadísticamente no significativa ($P=0.157$). Tanto la mortalidad precoz como la tardía fueron mayores en varones con un 60.9% y 56.4%, respectivamente. El índice de Charlson no estuvo relacionado con la mortalidad precoz (2 [2-4] versus 2 [2-3], $P=0.767$) ni tardía (2 [2-3] versus 2 [1-3], $P=0.776$). Sin embargo, algunas variables relacionadas con la comorbilidad, sí que mostraron relación con la mortalidad, tanto precoz como tardía. En este sentido, los pacientes con neoplasias hematológicas presentaron mayor mortalidad precoz (52.2% versus 19.1%, $P<0.001$) y tardía (37.2% versus 19.8%, $P=0.006$). Asimismo, los pacientes con neutropenia severa presentaron mayor mortalidad precoz (56.5% versus 16.5%, $P<0.001$) y tardía (42.3% versus 15.4%, $P<0.001$). Las bacteriemias con mayor mortalidad precoz y tardía fueron las nosocomiales (73.9% versus 52.1%, $P=0.012$ y 75.6% versus 46.9%, $P<0.001$, respectivamente). Con respecto al foco de la bacteriemia, la mayor mortalidad precoz y tardía tuvo lugar en los pacientes cuya bacteriemia se originó en un foco respiratorio (63.0% versus 12.4%, $P<0.001$ y 44.9% versus 11.1%, $P<0.001$, respectivamente). La gravedad de los episodios de bacteriemia se asoció estrechamente con la mortalidad. Así, los pacientes que desarrollaron shock séptico presentaron mayor mortalidad precoz (58.7% versus 19.1%, $P<0.001$) y tardía (44.9% versus 11.1%, $P<0.001$). Por otro lado, se observó una cierta relación entre el uso de tratamiento empírico inadecuado y la mortalidad precoz (47.8% versus 32.5%, $P=0.074$) pero éste no tuvo efecto sobre la mortalidad tardía (38.5% versus 33.9%, $P=0.589$). Algunos factores bacterianos mostraron una relación significativa con la mortalidad. Así, se observó que las cepas MDR presentaban mayor mortalidad precoz (67.4% versus 31.4%, $P<0.001$) y tardía (61.5% versus 27.2%, $P<0.001$). Dentro del fenotipo MDR, la presencia de cepas pertenecientes al clon de alto riesgo ST235 se asoció de forma significativa con la mortalidad precoz (32.6% versus 9.3%, $P<0.001$) y tardía (29.5% versus 6.2%, $P<0.001$). Las cepas ST175 no mostraron asociación significativa con la mortalidad precoz (28.3% versus 14.9%, $P=0.055$) pero sí con la mortalidad tardía (25.6% versus 13.6%, $P=0.034$). También, los episodios producidos por cepas con genotipo *exoU*⁺ presentaron una mayor mortalidad precoz (41.3% versus 15.5%, $P<0.001$) y tardía (37.2% versus 12.3%, $P<0.001$). Tanto la mortalidad precoz como la tardía también se relacionaron significativamente con la presencia del serotipo O11 (39.1% versus 9.8%, $P<0.001$ y 32.1% versus 7.4%, $P<0.001$, respectivamente). Finalmente, los pacientes cuyos hemocultivos tuvieron un TP corto presentaron una mortalidad significativamente mayor tanto precoz (14 [11-16] versus 16 [12-19], $P=0.005$) como tardía (14 [11-17] versus 17 [13-19], $P=0.001$) (**Tabla 27**).

5.3. Análisis estratificado de la mortalidad según la multirresistencia

Para conocer el grado de correlación entre diferentes variables relacionadas con la virulencia y la multirresistencia, se llevó a cabo un análisis estratificado de la mortalidad global en función del fenotipo MDR. En este análisis se demostró que el genotipo *exoU*⁺ y el serotipo O11 estaban asociados con un aumento de la mortalidad tardía tanto en pacientes con bacteriemia producida por cepas MDR (log-rank, $P=0.011$ y $P=0.007$) (**Figura 31**) como en las producidas por cepas no MDR (log-rank, $P=0.021$ y $P=0.008$) (**Figura 32**).

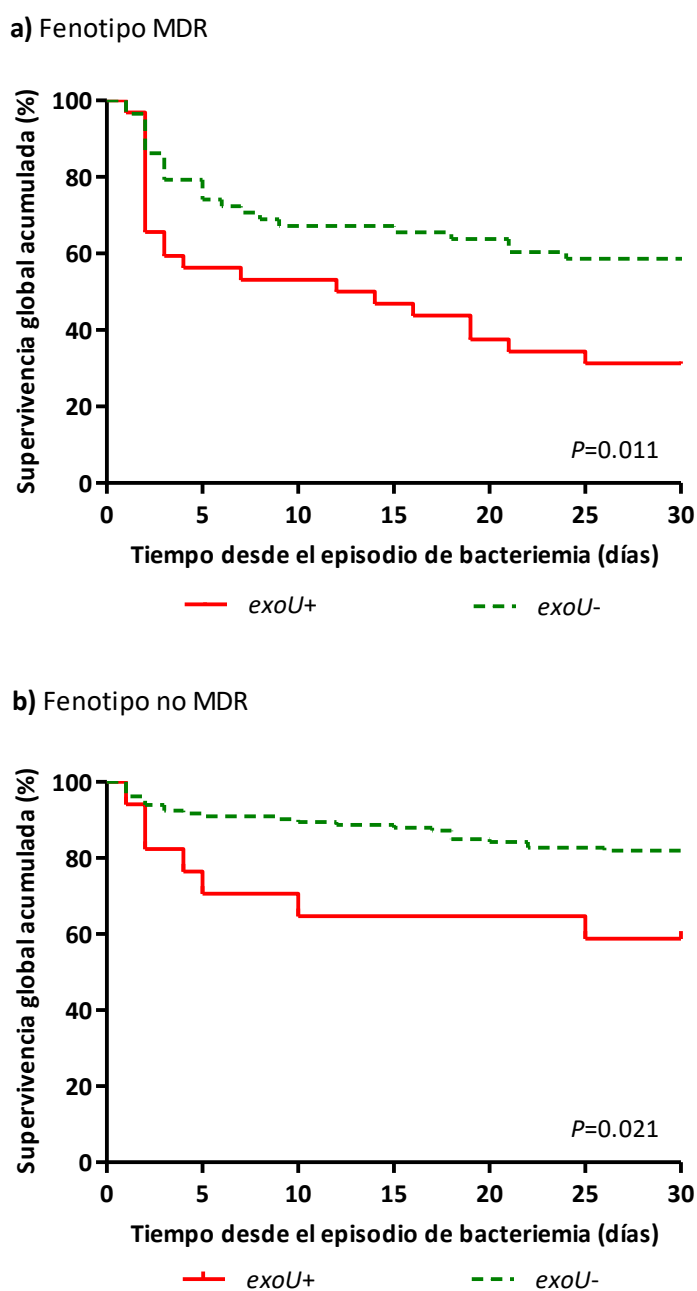
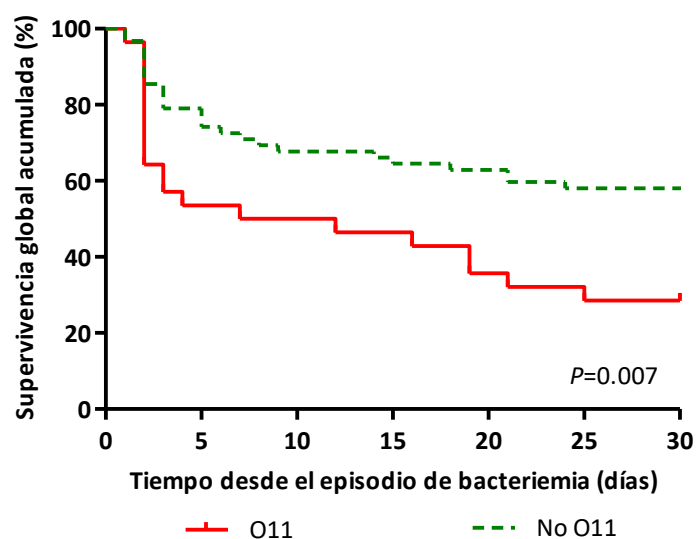


Figura 31. Comparación de las curvas Kaplan Meier de supervivencia global acumulada a 30 días en la cohorte *exoU*⁺ y *exoU*⁻ en función del fenotipo de resistencia MDR (a) y no MDR (b).

a) Fenotipo MDR



b) Fenotipo no MDR

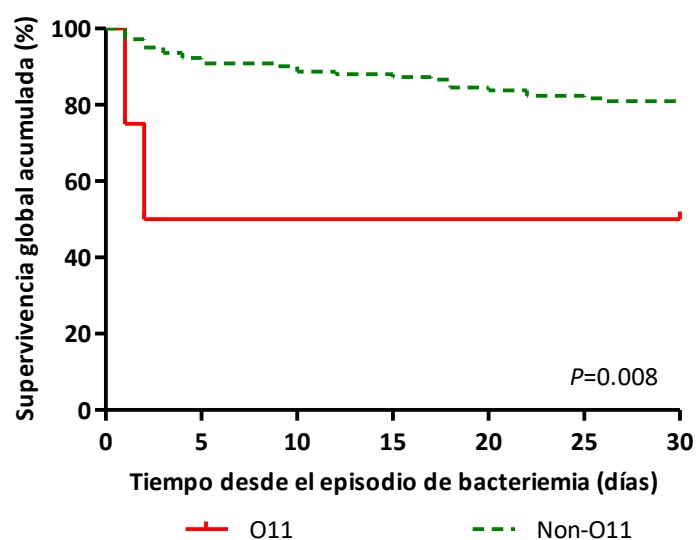


Figura 32. Comparación de las curvas Kaplan Meier de supervivencia global acumulada a 30 días en la cohorte O11 y no O11 en función del fenotipo de resistencia MDR (a) y no MDR (b).

5.4. Tasa de mortalidad según el tiempo de positividad de los hemocultivos

Se realizó un análisis sobre la influencia específica del TP de los hemocultivos en la tasa de mortalidad. En este análisis se demostró que el TP del hemocultivo se asociaba de forma estadísticamente significativa con la tasa de mortalidad, de forma inversamente proporcional, tanto a los 5 como a los 30 días. Este efecto fue mayor en los pacientes con un TP del hemocultivo corto con una tasa de mortalidad precoz ($P=0.006$) y tardía ($P=0.010$) más alta que los pacientes con un TP del hemocultivo largo (Figura 33).

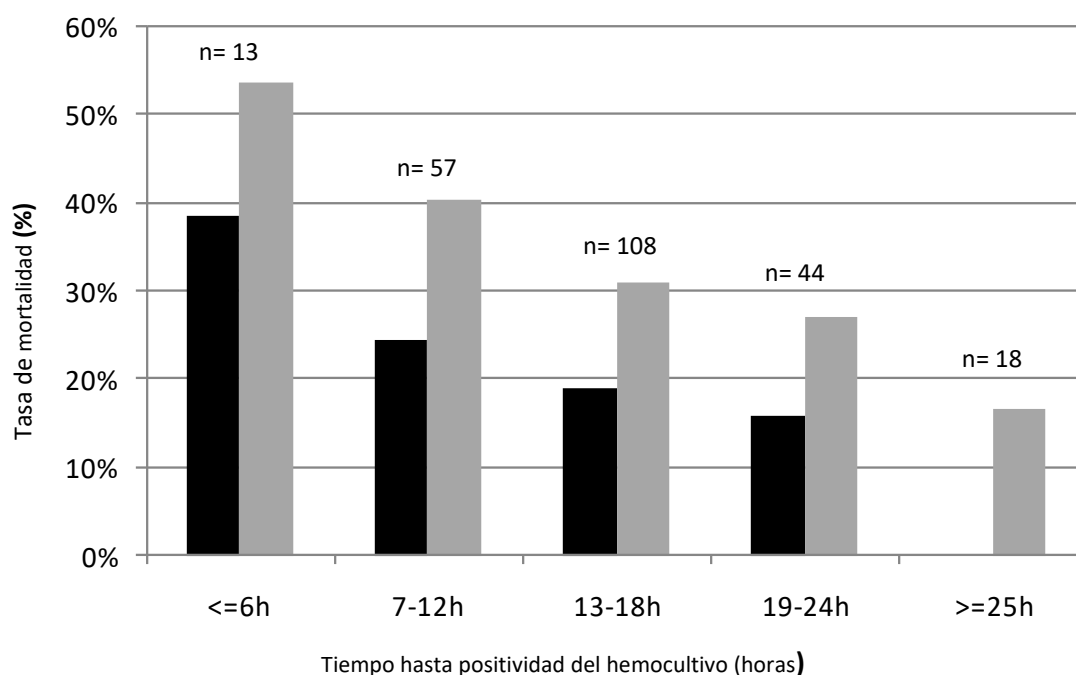


Figura 33. Relación entre la mortalidad y el tiempo hasta positividad del hemocultivo. La asociación estadística se llevó a cabo con el test de Mantle-Haenszel para tendencias lineales de mortalidad precoz (barras negras, $P=0.006$) y mortalidad tardía (barras grises, $P=0.010$).

5.5. Análisis multivariante de la mortalidad precoz y tardía

Debido a que se observó una correlación entre los factores dependientes del patógeno, resultando en colinealidad, se realizó un análisis multivariante utilizando modelos separados, que incluyeron el fenotipo MDR o la terapia empírica inadecuada, el genotipo *exoU*⁺ y el serotipo O11. Tras controlar los posibles factores de confusión en el modelo ajustado de regresión logística, se observó que la neutropenia, el foco respiratorio, el Pitt score y un TP corto del hemocultivo se asociaron de manera independiente con la mortalidad precoz en los diferentes modelos. Además, la inadecuación del tratamiento antibiótico empírico (OR: 4.57, IC 95%: 1.59-13.1, $P=0.005$), así como la infección producida por cepas con genotipo *exoU*⁺ (OR: 3.58, IC 95%: 1.31-9.79, $P=0.013$) o serotipo O11 (OR: 3.64, IC 95%: 1.20-11.1, $P=0.022$) fueron también predictores independientes de mortalidad precoz en los diferentes modelos. Por último, se observó que los episodios de bacteriemia producidos por cepas de *P. aeruginosa* MDR presentaban una tendencia hacia una mayor mortalidad precoz cuando se ajustaron por otras variables (OR: 2.39, IC 95%: 0.97-5.87, $P=0.057$). De manera similar se identificaron como predictores independientes de mortalidad tardía la neutropenia, el foco respiratorio, el Pitt score y un TP corto del hemocultivo en los diferentes modelos. Además, el fenotipo MDR (OR: 2.18, IC 95%: 1.04-4.58, $P=0.040$) y la adquisición nosocomial (OR: 1.62, IC 95%: 1.10-2.37, $P=0.012$) actuaron también como factores de riesgo de mortalidad tardía (**Tabla 28**).

Tabla 28. Análisis multivariante de factores predictores de mortalidad global precoz y tardía (n=240)^a.

Variable	Mortalidad precoz (5 días)						Mortalidad tardía (30 días)			
	Modelo 1		Modelo 2		Modelo 3		Modelo 1		Modelo 2	
	aOR (IC 95%)	P	aOR (IC 95%)	P	aOR (IC 95%)	P	aOR (IC 95%)	P	aOR (IC 95%)	P
Neutropenia severa (n [%])	9.47 (3.52-25.5)	<0.001	6.57 (2.62-16.5)	<0.001	9.21 (3.40-24.9)	<0.001	2.97 (1.38-6.35)	0.005	2.80 (1.32-5.92)	0.007
Foco respiratorio (n [%])	3.22 (2.02-5.14)	<0.001	2.94 (1.87-4.62)	<0.001	3.23 (2.01-5.16)	<0.001	1.93 (1.30-2.86)	0.001	1.95 (1.31-2.90)	0.001
Adquisición nosocomial (n [%])	—	—	—	—	—	—	1.62 (1.10-2.37)	0.012	1.56 (1.07-2.27)	0.019
Pitt score ≥2 (n [%])	2.49 (1.39-4.44)	0.002	2.14 (1.23-3.71)	0.007	2.42 (1.34-4.36)	0.003	1.86 (1.28-2.70)	0.001	1.81 (1.25-2.63)	0.002
Genotipo <i>exoU+</i> / <i>exoS-</i> (n [%])	2.99 (1.06-8.42)	0.038	3.58 (1.31-9.79)	0.013			3.89 (1.65-9.19)	0.002		
Serotipo O11 (n [%])					3.64 (1.20-11.1)	0.022			3.63 (1.42-9.31)	0.007
Fenotipo MDR (n [%])			2.39 (0.97-5.87)	0.057			2.18 (1.04-4.58)	0.040	2.17 (1.03-4.58)	0.042
Tratamiento empírico inadecuado (n [%])	4.57 (1.59-13.1)	0.005			4.17 (1.42-12.2)	0.009	—	—	—	—
TP del hemocultivo, horas (mediana [RIQ])	0.88 (0.80-0.97)	0.009	0.90 (0.82-0.98)	0.014	0.88 (0.81-0.97)	0.010	0.91 (0.86-0.97)	0.005	0.92 (0.86-0.97)	0.008

aOR: *odds ratio* ajustada; IC: intervalo de confianza; MDR: multirresistente; TP: tiempo hasta positividad; -: variables incluidas en el modelo inicial de análisis multivariante, y excluidas posteriormente en el proceso de selección de pasos hacia atrás. ^aExcluidos 3 pacientes en los que se limitó el esfuerzo terapéutico (n=240).

6. Virulencia de *P. aeruginosa* en modelos experimentales

6.1. Descripción de las cepas bacterianas

El siguiente paso fue determinar las características patogénicas de las cepas invasivas de *P. aeruginosa* en función de su fenotipo de resistencia, incluyendo los clones de alto riesgo, y su genotipo de virulencia. Para ello, se realizó un ensayo *in vitro* de citotoxicidad celular y un ensayo *in vivo* de letalidad con el nematodo *C. elegans* (Figura 34).

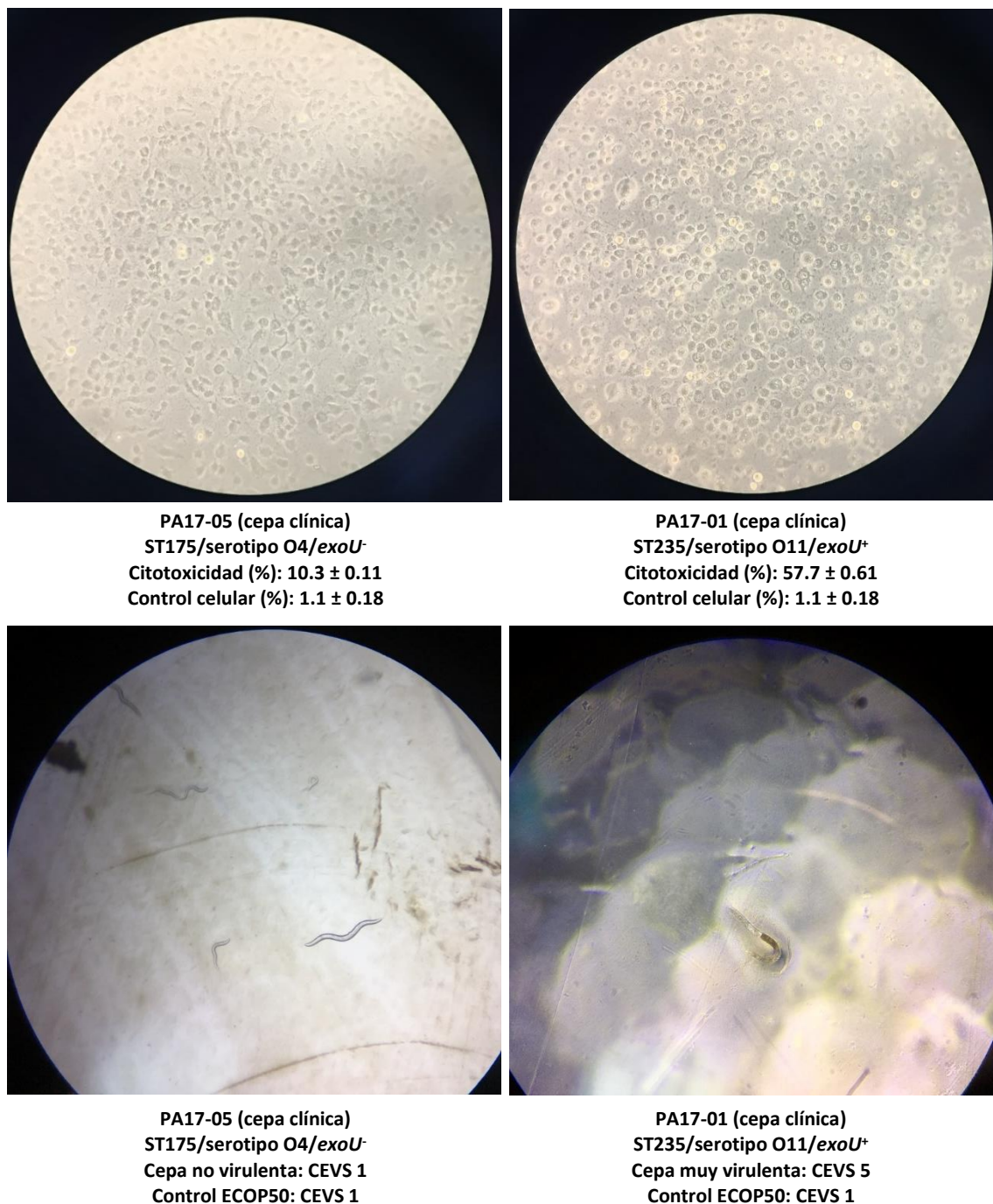


Figura 34. Efecto de cepas clínicas de *P. aeruginosa* en los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Se emplearon 38 cepas clínicas representativas de la cohorte global y las cepas de referencia PAO1 (*exoU*⁺/*exoS*⁺, referencia de invasividad) y PA14 (*exoU*⁺/*exoS*⁻, referencia de citotoxicidad). Las características de las 38 cepas de *P. aeruginosa* estudiadas y los principales resultados de los ensayos *in vitro* e *in vivo* se muestran en la **Tabla 29**. Más de la mitad de las cepas mostraron un fenotipo MDR (55.3% [21/38]), siendo en su mayoría XDR (95.2% [20/21] de las cepas MDR y 52.6% [20/38] del total) y en menor frecuencia MDR no XDR (4.8% [1/21] de las cepas MDR y 2.6% [1/38] del total). Por el contrario, hubo un total de 17 (44.7%) cepas con perfil no MDR, con una mayor representación del fenotipo ModR (64.7% [11/17] de las cepas no MDR y 28.9% [11/38] del total) y en menor frecuencia MultiS (35.3% [6/17] de las cepas no MDR y 15.8% [6/38] del total). Entre las cepas MDR la carbapenemasa más comúnmente identificada fue GES-5 (57.1% [12/21]), seguida de VIM-2 (23.8% [5/21]). El análisis PFGE mostró una estructura poblacional clonal entre las cepas MDR (con 6 pulsotipos PFGE diferentes: A [n=12], B [n=5], C [n=1], D [n=1], E [n=1] y F [n=1]). En contraposición, las cepas no MDR estuvieron representadas por 17 pulsotipos PFGE diferentes mostrando una mayor diversidad clonal. El análisis MLST mostró que la mayoría de las cepas MDR pertenecían principalmente a los dos clones de alto riesgo internacionales, incluyendo el clon ST235 (57.1% [12/21], pulsotipo PFGE A) y el clon ST175 (23.8% [5/21], pulsotipo PFGE B). Las cepas MDR restantes y todas las cepas no MDR pertenecieron a diferentes ST. La presencia de los genes *exoT* y *exoY* se documentó en la mayoría de las cepas (97.4% [37/38] y 92.1% [35/38], respectivamente). De forma paralela, todas las cepas fueron positivas para los genes *exoU* o *exoS* (55.3% [21/38] y 34.2% [13/38], respectivamente), excepto 4 (10.5%) cepas que fueron negativas para ambos genes. El genotipo *exoU*⁺ se encontró en 12 (57.1%) de las cepas MDR y en 9 (52.9%) de las cepas no MDR. Todas las cepas pertenecientes al clon ST175 mostraron el genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁺, mientras que todas las cepas ST235 mostraron el genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻. Debido a que los genes *exoT* y *exoY* fueron positivos en la mayoría de las cepas, éstos no se incluyeron en los análisis de los ensayos experimentales. El serotipo del antígeno O se documentó en la mayoría de las cepas (97.4% [37/38]), siendo tan sólo 1 (2.6%) no tipable. El serotipo más prevalente fue el O11 (36.8% [14/38]), seguido del serotipo O1 (18.4% [7/38]) y O4 (13.2% [5/38]). Los serotipos O4 y O11 se encontraron con mayor frecuencia en los aislados con fenotipo MDR (23.8% [5/21] y 47.6% [10/21]), estando presentes en todas las cepas pertenecientes al clon de alto riesgo ST175 (100% [5/5], serotipo O4) y en la mayoría de las cepas ST235 (83.3% [10/12], serotipo O11). Las dos (16.7%) cepas ST235 restantes mostraron el serotipo O1. Las cepas con genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻ presentaron con frecuencia el serotipo O11 (66.7% [14/21] y O1 (19.0% [4/21]), mientras que las cepas pertenecientes al genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁺ se asociaron a los serotipos O4 (38.5% [5/13]) y O6 (23.1% [3/13]).

Tabla 29. Resultados de los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Cepa	Observaciones	Resistencia	PFGE	MLST	Serotipo O	Carbapenemasa	Genotipo SST3				Citotoxicidad ^a	CEVS
							<i>exoU</i>	<i>exoS</i>	<i>exoT</i>	<i>exoY</i>		
PA16-03	Cepa clínica	XDR	No clonal	17	O1	No	-	+	+	+	16.0 ± 1.1	2
PA16-13	Cepa clínica	XDR	Clonal (A)	235	O1	GES-5	+	-	+	+	31.1 ± 0.7	4
PA16-15	Cepa clínica	XDR	No clonal	1016	O10	No	-	+	+	+	8.0 ± 1.3	3
PA16-18	Cepa clínica	XDR	Clonal (B)	175	O4	VIM-2	-	+	+	+	13.1 ± 0.6	2
PA16-21	Cepa clínica	XDR	No clonal	897	O6	No	-	+	+	+	9.2 ± 0.6	2
PA16-25	Cepa clínica	MultiS	No clonal	1113	O5	No	+	-	+	+	26.8 ± 0.9	5
PA16-27	Cepa clínica	ModR	No clonal	1027	O1	No	-	-	-	-	78.2 ± 0.1	5
PA16-31	Cepa clínica	ModR	No clonal	694	O1	No	+	-	+	+	79.9 ± 0.5	4
PA16-32	Cepa clínica	MDR	No clonal	259	O1	No	-	+	+	+	34.2 ± 0.4	4
PA16-33	Cepa clínica	MultiS	No clonal	1491	O2	No	-	-	+	-	37.3 ± 0.5	3
PA16-34	Cepa clínica	MultiS	No clonal	511	O3	No	-	+	+	+	19.2 ± 0.1	5
PA16-35	Cepa clínica	ModR	No clonal	1248	O1	No	+	-	+	+	61.6 ± 0.8	3
PA16-37	Cepa clínica	ModR	No clonal	308	O11	No	+	-	+	+	63.2 ± 0.2	3
PA16-39	Cepa clínica	ModR	No clonal	179	O6	No	-	+	+	+	39.7 ± 0.2	4
PA16-43	Cepa clínica	ModR	No clonal	560	O7	No	+	-	+	+	50.3 ± 0.3	5

PFGE: electroforesis en gel de campo pulsante; MLST: *multilocus sequence typing*; SST3: sistema de secreción tipo 3; CEVS: *Caenorhabditis elegans virulence scoring*; MDR: multirresistente; XDR: extremadamente resistente; MultiS: multisensible; ModR: moderadamente resistente; NA: no aplicable; ND: no disponible; NT: no tipable. ^aMedia ± desviación estándar.

Tabla 29. Resultados de los ensayos *in vitro* e *in vivo* (continuación).

Cepa	Observaciones	Resistencia	PFGE	MLST	Serotipo O	Carbapenemasa	Genotipo SST3				Citotoxicidad ^a	CEVS
							<i>exoU</i>	<i>exoS</i>	<i>exoT</i>	<i>exoY</i>		
PA16-60	Cepa clínica	MultiS	No clonal	2014	O11	No	+	-	+	+	56.7 ± 0.9	5
PA17-01	Cepa clínica	XDR	Clonal (A)	235	O11	GES-5	+	-	+	+	57.7 ± 0.6	5
PA17-02	Cepa clínica	XDR	Clonal (B)	175	O4	VM-2	-	+	+	+	9.7 ± 1.0	2
PA17-03	Cepa clínica	XDR	Clonal (A)	235	O11	GES-5	+	-	+	+	47.3 ± 1.3	5
PA17-04	Cepa clínica	XDR	Clonal (A)	235	O11	GES-5	+	-	+	+	55.3 ± 0.6	5
PA17-05	Cepa clínica	XDR	Clonal (B)	175	O4	VIM-2	-	+	+	+	10.3 ± 0.1	1
PA17-06	Cepa clínica	XDR	Clonal (A)	235	O11	GES-5	+	-	+	+	60.8 ± 0.2	5
PA17-07	Cepa clínica	XDR	Clonal (A)	235	O11	GES-5	+	-	+	+	52.0 ± 0.4	5
PA17-08	Cepa clínica	XDR	Clonal (A)	235	O11	GES-5	+	-	+	+	59.5 ± 0.9	5
PA17-09	Cepa clínica	XDR	Clonal (B)	175	O4	VIM-2	-	+	+	+	11.3 ± 0.1	2
PA17-10	Cepa clínica	XDR	Clonal (B)	175	O4	VIM-2	-	+	+	+	10.8 ± 0.6	2
PA17-11	Cepa clínica	XDR	Clonal (A)	235	O11	GES-5	+	-	+	+	59.8 ± 0.8	5
PA17-12	Cepa clínica	XDR	Clonal (A)	235	O1	GES-5	+	-	+	+	31.1 ± 1.1	5
PA17-13	Cepa clínica	XDR	Clonal (A)	235	O11	GES-5	+	-	+	+	59.8 ± 0.2	5
PA17-14	Cepa clínica	XDR	Clonal (A)	235	O11	GES-5	+	-	+	+	46.5 ± 0.1	5

PFGE: electroforesis en gel de campo pulsante; MLST: *multilocus sequence typing*; SST3: sistema de secreción tipo 3; CEVS: *Caenorhabditis elegans virulence scoring*; MDR: multirresistente; XDR: extremadamente resistente; MultiS: multisensible; ModR: moderadamente resistente; NA: no aplicable; ND: no disponible; NT: no tipable. ^aMedia ± desviación estándar.

Tabla 29. Resultados de los ensayos *in vitro* e *in vivo* (continuación).

Cepa	Observaciones	Resistencia	PFGE	MLST	Serotipo O	Carbapenemasa	Genotipo SST3				Citotoxicidad ^a	CEVS
							<i>exoU</i>	<i>exoS</i>	<i>exoT</i>	<i>exoY</i>		
PA17-15	Cepa clínica	XDR	Clonal (A)	235	O11	GES-5	+	-	+	+	59.7 ± 0.2	5
PA17-26	Cepa clínica	ModR	No clonal	1903	O5	No	-	-	+	+	22.6 ± 0.5	3
PA17-27	Cepa clínica	ModR	No clonal	127	O8	No	-	-	+	-	22.3 ± 0.4	3
PA17-30	Cepa clínica	ModR	No clonal	313	NT	No	+	-	+	+	42.6 ± 0.6	5
PA17-33	Cepa clínica	ModR	No clonal	309	O11	No	+	-	+	+	48.4 ± 0.1	4
PA17-34	Cepa clínica	MultiS	No clonal	852	O5	No	-	+	+	+	28.2 ± 0.4	5
PA17-37	Cepa clínica	MultiS	No clonal	1284	O11	No	+	-	+	+	56.8 ± 0.1	5
PA17-39	Cepa clínica	ModR	No clonal	395	O6	No	-	+	+	+	31.5 ± 0.9	3
PAO1	Cepa referencia	MultiS	ND	549	O5	NA	-	+	+	+	10.6 ± 0.1	4
PA14	Cepa referencia	MultiS	ND	253	O10	NA	+	-	+	+	81.1 ± 1.2	5

PFGE: electroforesis en gel de campo pulsante; MLST: *multilocus sequence typing*; SST3: sistema de secreción tipo 3; CEVS: *Caenorhabditis elegans virulence scoring*; MDR: multirresistente; XDR: extremadamente resistente; MultiS: multisensible; ModR: moderadamente resistente; NA: no aplicable; ND: no disponible; NT: no tipable. ^aMedia ± desviación estándar.

La media de la citotoxicidad de las cepas clínicas fue de $39.7 \pm 3.4\%$. Los valores de citotoxicidad fueron variables de una cepa a otra. En la **Figura 35** se muestran los valores (media \pm DS) de citotoxicidad de cada una de las cepas a estudio.

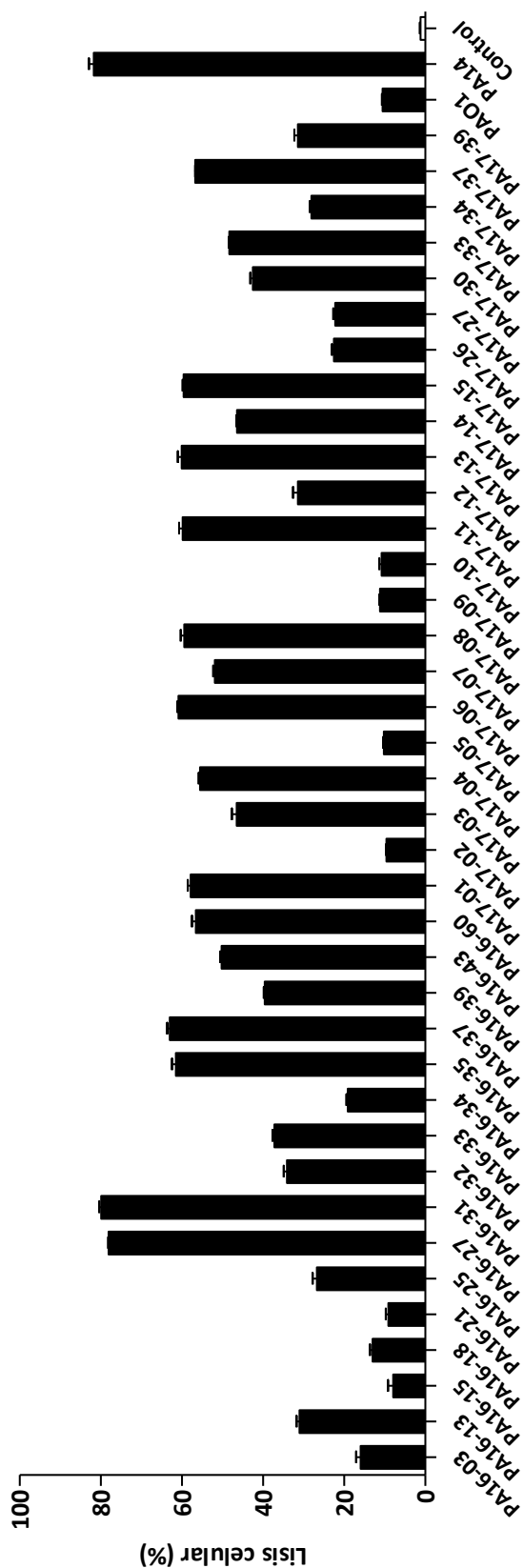


Figura 35. Citotoxicidad sobre cultivos de células A549 de las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas. Se indican los resultados de cada cepa en color negro. Las cepas de referencia PA01 y PA14 se incluyeron con fines comparativos. Los valores son medias \pm desviaciones estándar de al menos tres pocillos de tres placas independientes.

En cuanto a la letalidad observada en el nematodo, la mayoría de las cepas fueron virulentas (81.6% ([31/38]) con una puntuación de CEVS 3 (18.4% [7/38]), CEVS 4 (13.2% [5/38]) y CEVS 5 (50% [19/38]), mientras que tan sólo 7 (18.4%) cepas fueron no virulentas con una puntuación de CEVS 1 (2.6% [1/38]) y CEVS 2 (15.8% [6/38]). La dinámica de letalidad de los nematodos y la distribución de los valores del CEVS de las cepas clínicas se muestran en la **Figura 36 y 37**.

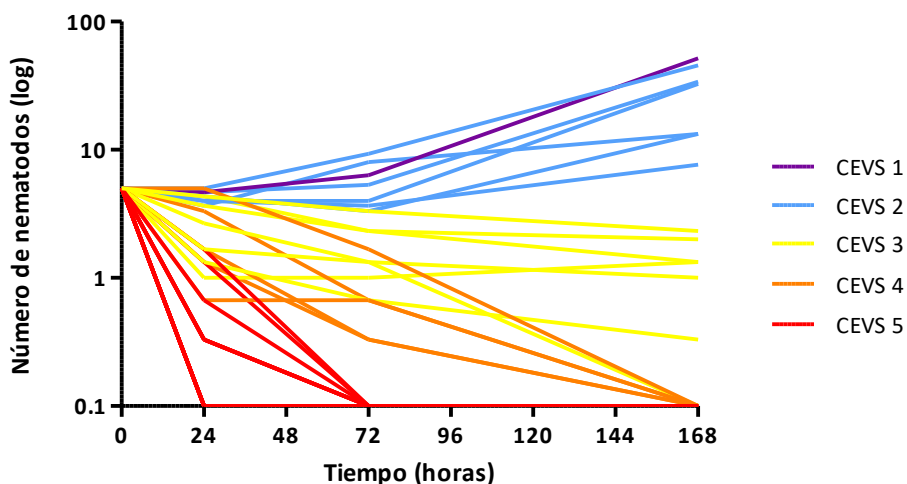


Figura 36. Dinámica de letalidad/multiplicidad de *C. elegans* en presencia de aislamientos invasivos de *P. aeruginosa*. Los aislamientos de *P. aeruginosa* se clasificaron en 5 niveles de virulencia (CEVS 1-5) dependiendo del efecto sobre la viabilidad de los nematodos, y cada uno se indica con un color diferente. Se incluyen dos niveles (CEVS 1-2) en los que las cepas se consideraron no virulentas (viabilidad del nematodo) y tres niveles (CEVS 3-5) de virulencia (letalidad del nematodo).

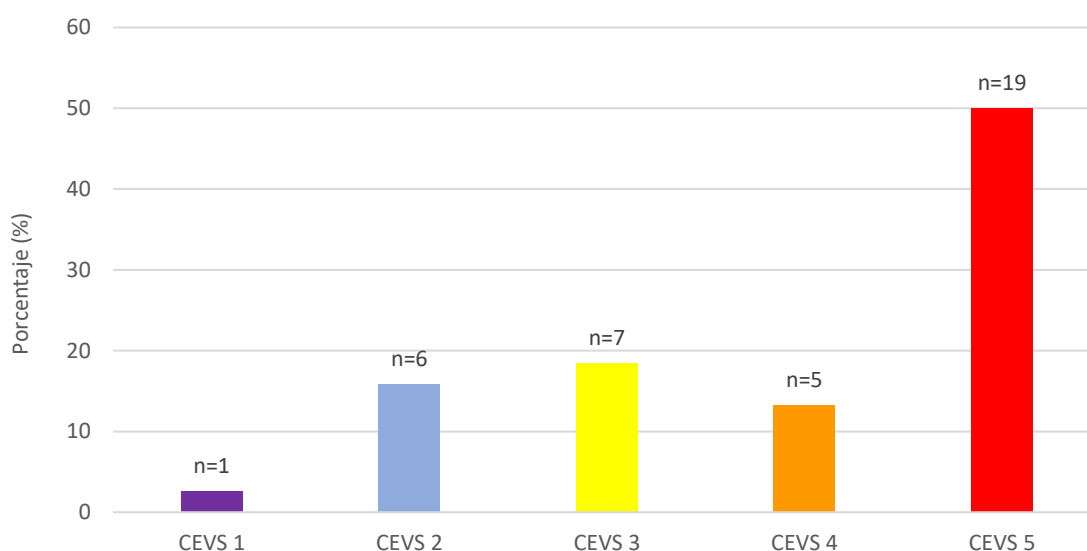


Figura 37. Frecuencia de cada categoría de CEVS entre los aislados invasivos de *P. aeruginosa*. Los aislamientos de *P. aeruginosa* se clasificaron en 5 niveles de virulencia (CEVS 1-5) dependiendo del efecto sobre la viabilidad de los nematodos, y cada uno se indica con un color diferente. Se incluyen dos niveles (CEVS 1-2) en los que las cepas se consideraron no virulentas (viabilidad del nematodo) y tres niveles (CEVS 3-5) de virulencia (letalidad del nematodo). Se indican los números absolutos.

6.2. Impacto del fenotipo MDR en la virulencia

La capacidad para lisar las células epiteliales alveolares difirió entre las cepas según el fenotipo de resistencia. Así, las cepas MDR (n=21) mostraron una menor citotoxicidad en comparación con las cepas no MDR (n=17) ($45.0\% \pm 18.8\%$ versus $35.4 \pm 21.3\%$, $P=0.044$) (**Figura 38**).

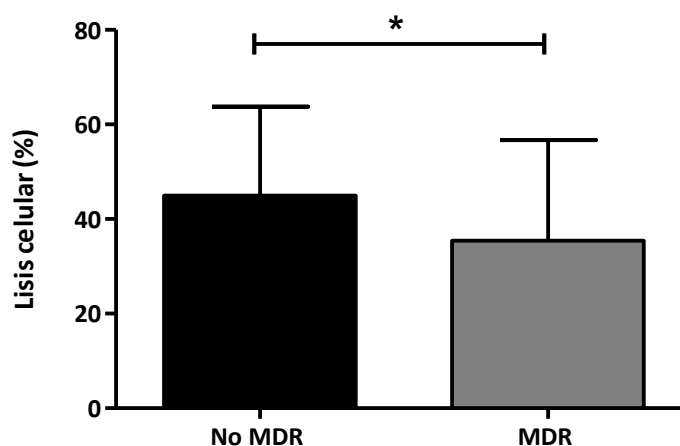


Figura 38. Citotoxicidad sobre cultivos de células A549 en función del fenotipo de resistencia. Se indican los resultados tras 3 horas de infección (MOI de 100). Los valores son medias \pm desviaciones estándar de al menos tres pocillos de tres placas independientes. Los valores medios que son significativamente diferentes se indican mediante barras y asteriscos: *, $P<0.05$.

Asimismo, el análisis de la letalidad del nematodo documentó que las cepas no MDR mostraron una mayor virulencia (CEVS 3-5) en comparación con las cepas MDR (100% [17/17] versus 66.7% [14/21], $P=0.011$) en el modelo de *C. elegans* (**Figura 39**).

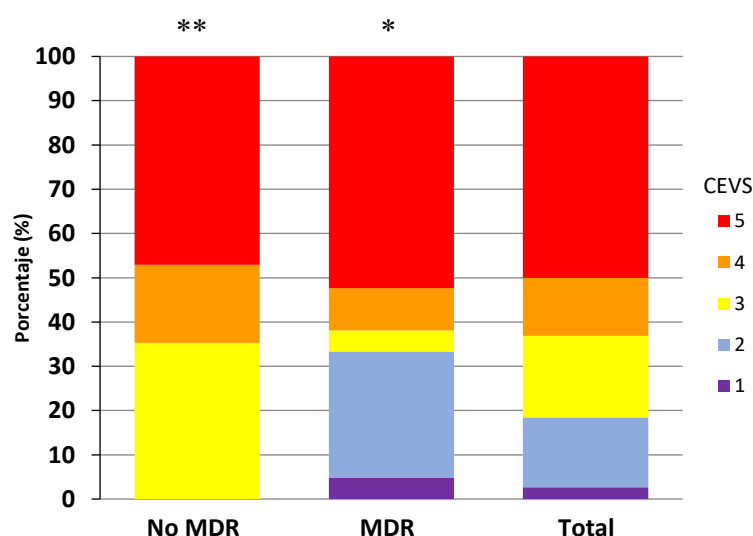


Figura 39. Score de virulencia de *C. elegans* (CEVS) en función del fenotipo de resistencia. Las cepas no virulentas (CEVS 1 a 2) se muestran en tonos morado y azul y las cepas virulentas (CEVS 3 a 5) se muestran en tonos amarillo, naranja y rojo. Los valores que son significativamente diferentes se indican mediante asteriscos: *, menor virulencia ($P<0.05$); **, mayor virulencia ($P<0.05$).

6.3. Impacto de los clones de alto riesgo ST175 y ST235 en la virulencia

Sin embargo, se encontraron diferencias entre las cepas MDR pertenecientes a los clones de alto riesgo. Así, el clon ST235 (n=12) mostró una elevada citotoxicidad en comparación con el clon ST175 (n=5) ($51.8 \pm 10.6\%$ versus $11.0 \pm 1.3\%$, $P<0.001$) (**Figura 40**).

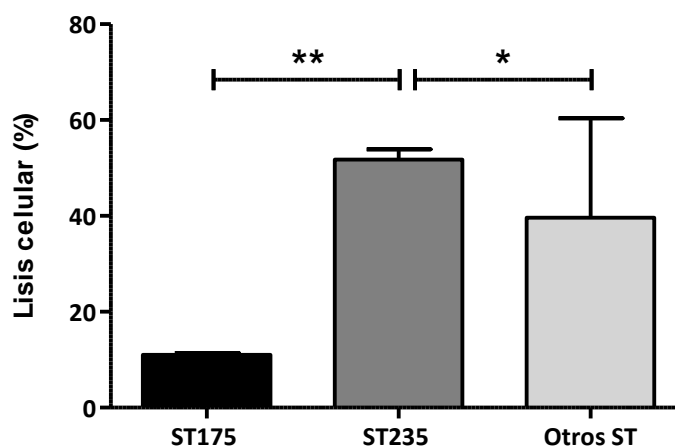


Figura 40. Citotoxicidad sobre cultivos de células A549 en función de la clonalidad. Se indican los resultados tras 3 horas de infección (MOI de 100). Los valores son medias \pm desviaciones estándar de al menos tres pocillos de tres placas independientes. Los valores medios que son significativamente diferentes se indican mediante barras y asteriscos de la siguiente manera: *, $P<0.05$; **, $P<0.001$.

De igual modo, todas las cepas pertenecientes al clon ST235 presentaron una mayor virulencia (CEVS 3-5) (100% [12/12] versus 73.1% [19/26], $P=0.075$), mientras que todas las cepas ST175 fueron no virulentas (CEVS 1-2) (100% [5/5] versus 6.1% [2/33], $P<0.001$) (**Figura 41**).

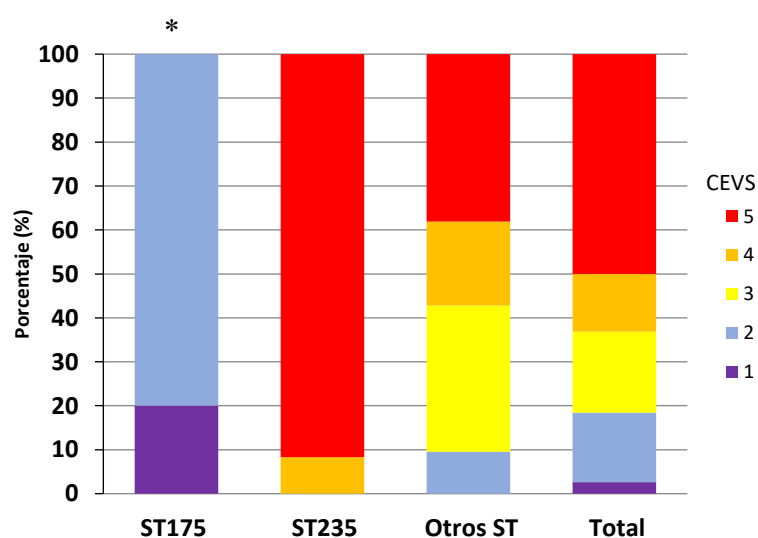


Figura 41. Score de virulencia de *C. elegans* (CEVS) en función de la clonalidad. Las cepas no virulentas (CEVS 1 a 2) se muestran en tonos morado y azul y las cepas virulentas (CEVS 3 a 5) se muestran en tonos amarillo, naranja y rojo. Los valores que son significativamente diferentes se indican mediante asteriscos: *, menor virulencia ($P<0.05$).

Visto de otra forma, la **Figura 42** ilustra la mayor virulencia del clon ST235 en la dinámica de letalidad de *C. elegans* a lo largo del tiempo (168 horas). Las cepas pertenecientes al clon ST235 presentaron una alta letalidad (CEVS 3-5) similar a la de las cepas de referencia PAO1 y PA14 (virulentas) (**Figura 42a**), mientras que la virulencia del clon ST175 fue especialmente baja (CEVS 1-2) asemejándose a la cepa control ECOP50 (no virulenta) (**Figura 42b**).

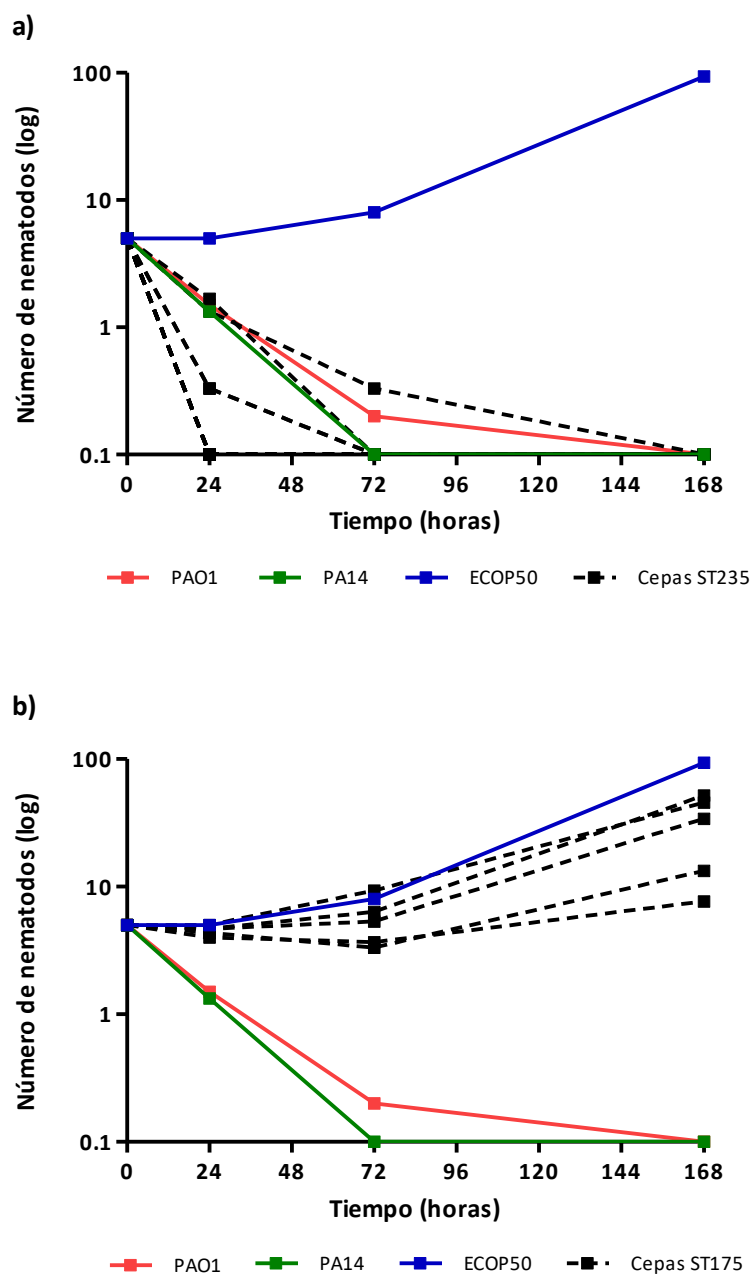


Figura 42. Letalidad de los clones de alto riesgo en el modelo de *C. elegans*. Se indican los resultados de los clones de alto riesgo ST235 (a) y ST175 (b). Se muestra el número medio de nematodos supervivientes a las 0, 24, 72 y 168 horas. Los valores de la cepa PAO1 (línea roja continua) y PA14 (línea verde continua) se incluyeron con fines comparativos. La cepa OP50 de *E. coli* (línea azul continua), utilizada para alimentar a los nematodos, se usó como control no patógeno.

6.4. Impacto del genotipo *exoU*⁺ en la virulencia

De nuevo, la capacidad para lisar las células epiteliales difirió entre las cepas en función del genotipo del SST3. Así, las cepas con genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻ (n=21) fueron más citotóxicas que las cepas *exoU*⁻/*exoS*⁺ (n=13) ($52.7 \pm 12.2\%$ versus $18.5 \pm 10.8\%$; $P<0.001$) (Figura 43).

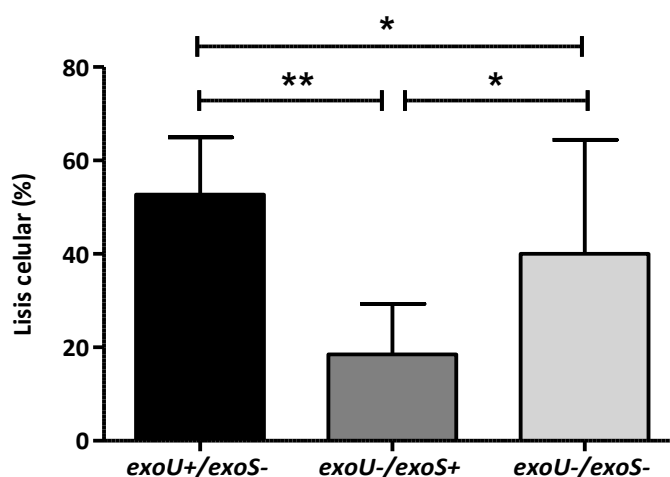


Figura 43. Citotoxicidad sobre cultivos de células A549 en función del genotipo del SST3. Se indican los resultados tras 3 horas de infección (MOI de 100). Los valores son medias \pm desviaciones estándar de al menos tres pocillos de tres placas independientes. Los valores medios que son significativamente diferentes se indican mediante barras y asteriscos de la siguiente manera: *, $P<0.05$; **, $P<0.001$.

De igual modo, se constató que los aislamientos con genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻ eran más virulentos (CEVS 3-5) que los pertenecientes al genotipo *exoU*⁻/*exoS*⁺ (100% [21/21] versus 46.2% [6/13]; $P<0.001$) en el modelo de *C. elegans* (Figura 44).

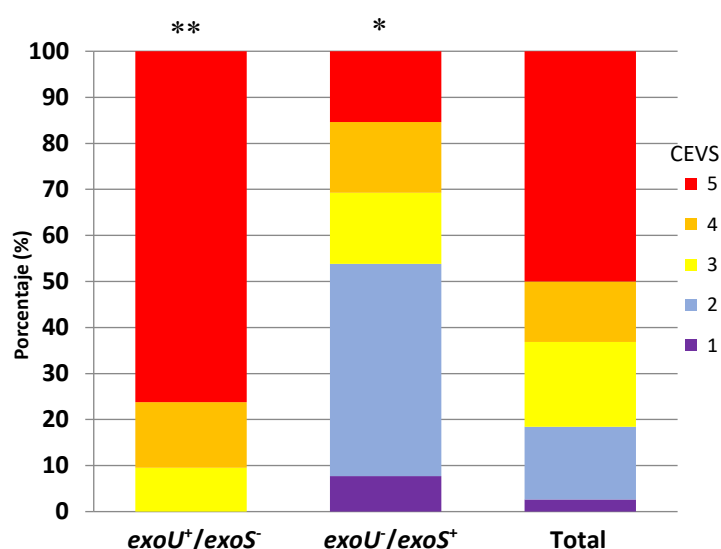


Figura 44. Score de virulencia de *C. elegans* (CEVS) en función del genotipo del SST3. Las cepas no virulentas (CEVS 1 a 2) se muestran en tonos morado y azul y las cepas virulentas (CEVS 3 a 5) se muestran en tonos amarillo, naranja y rojo. Los valores que son significativamente diferentes se indican mediante asteriscos: *, menor virulencia ($P<0.05$); **, mayor virulencia ($P<0.05$).

Visto de otra forma, la **Figura 45** ilustra la mayor virulencia de las cepas con genotipo *exoU*⁺ en la dinámica de letalidad de *C. elegans* a lo largo del tiempo (168 horas). Las cepas *exoU*⁺ presentaron una alta letalidad (CEVS 3-5) similar a la de las cepas de referencia PAO1 y PA14 (virulentas) (**Figura 45a**), mientras que la virulencia de las cepas *exoU*⁻ fue especialmente baja (CEVS 1-2) asemejándose a la cepa control ECOP50 (no virulenta) (**Figura 45b**).

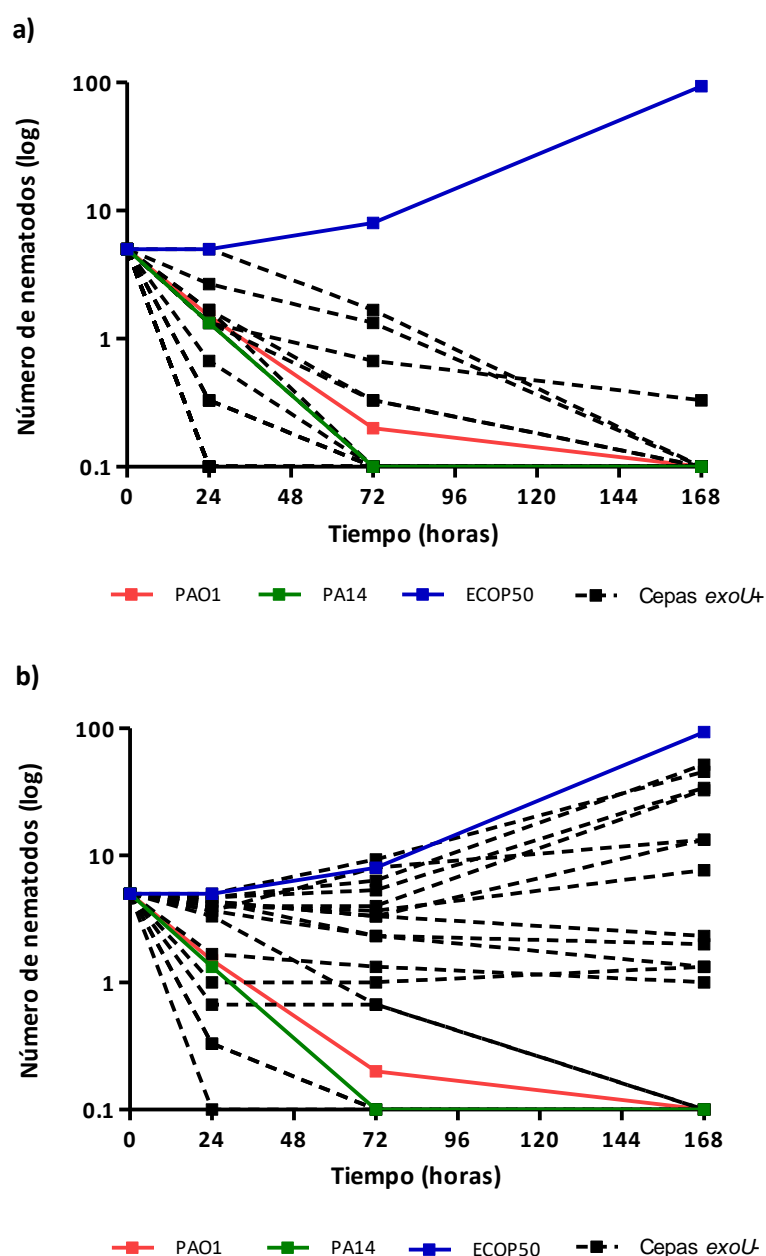


Figura 45. Letalidad de los genotipos del SST3 en el modelo de *C. elegans*. Se indican los resultados de los clones del genotipo *exoU*⁺ (a) y *exoU*⁻ (b). Se muestra el número medio de nematodos supervivientes a las 0, 24, 72 y 168 horas. Los valores de la cepa PAO1 (línea roja continua) y PA14 (línea verde continua) se incluyeron con fines comparativos. La cepa OP50 de *E. coli* (línea azul continua), utilizada para alimentar a los nematodos, se usó como control no patógeno.

6.5. Impacto del serotipo O11 en la virulencia

Una vez más, la capacidad para lisar las células epiteliales alveolares difirió entre las cepas en función del serotipo O. Así, las cepas con serotipo O11 ($n=14$) fueron más citotóxicas que las cepas con serotipo O4 ($n=5$) ($56.0 \pm 5.4\%$ versus $11.0 \pm 1.25\%$, $P<0.001$) (**Figura 46**).

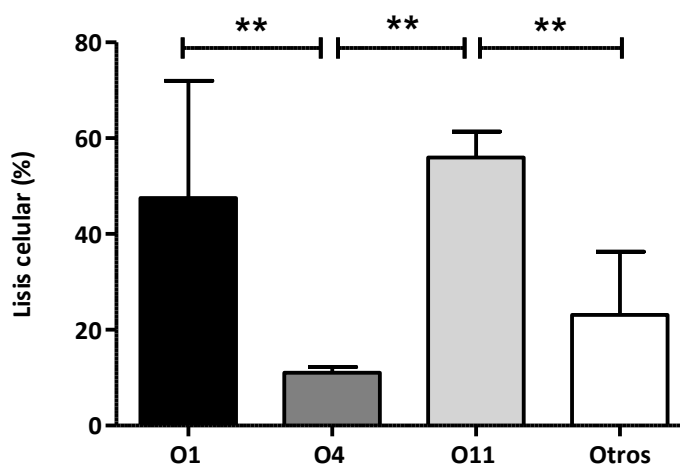


Figura 46. Citotoxicidad sobre cultivos de células A549 en función del serotipo O. Se indican los resultados tras 3 horas de infección (MOI de 100). Los valores son medias \pm desviaciones estándar de al menos tres pocillos de tres placas independientes. Los valores medios que son significativamente diferentes se indican mediante barras y asteriscos de la siguiente manera: ** $P<0.001$.

De igual modo, todas las cepas con serotipo O11 fueron virulentas (CEVS 3-4) (100% [14/14] versus 70.8% [17/24], $P=0.033$), mientras que todas las cepas O4 fueron no virulentas (CEVS 1-2) (100% [5/5] versus 6.1% [2/33], $P<0.001$) en el modelo de *C. elegans* (**Figura 47**).

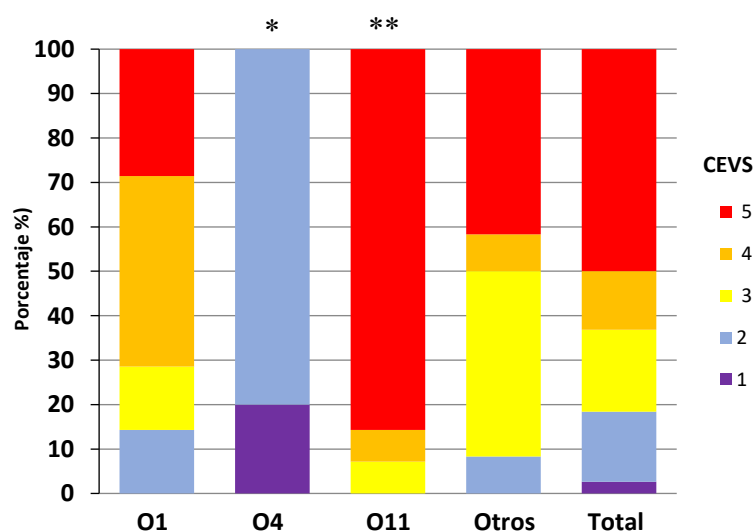


Figura 47. Score de virulencia de *C. elegans* (CEVS) en función del serotipo del antígeno O. Las cepas no virulentas (CEVS 1 a 2) se muestran en tonos morado y azul y las cepas virulentas (CEVS 3 a 5) se muestran en tonos amarillo, naranja y rojo. Los valores que son significativamente diferentes se indican mediante asteriscos: *, menor virulencia ($P<0.05$); **, mayor virulencia ($P<0.05$).

6.6. Asociación entre la multirresistencia y la virulencia en el modelo de *C. elegans*

Finalmente, se determinó la asociación del fenotipo de resistencia, los clones de alto riesgo, el genotipo del SST3, el serotipo O y la citotoxicidad de las cepas invasivas con la virulencia en el modelo de infección de *C. elegans* (Tabla 30). Las cepas que mostraron una menor virulencia (CEVS 1-2) presentaron más frecuentemente el fenotipo MDR (100% [17/17] versus 66.7% [14/21], $P=0.011$), el clon de alto riesgo ST175 (71.4% [5/7] versus 0% [0/31], $P<0.001$), el genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁺ (100% [7/7] versus 19.4% [6/31], $P<0.001$) y el serotipo O4 (71.4% [5/7] versus 0% [0/31], $P<0.001$) que aquellas que mostraron una mayor virulencia (CEVS 3-5). Mientras que el efecto contrario se documentó para el fenotipo no MDR (54.8% [17/31] versus 0% [0/7], $P=0.011$), el clon de alto riesgo ST235 (38.7% [12/31] versus 0% [0/7], $P=0.075$), el genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻ (67.7% [21/31] versus 0% [0/7], $P=0.002$) y el serotipo O11 (45.2% [14/31] versus 0% [0/7], $P=0.033$) que fueron significativamente más frecuentes entre las cepas que mostraron una alta virulencia. Con respecto a la citotoxicidad, las cepas virulentas mostraron de manera significativa una mayor citotoxicidad en comparación con las cepas no virulentas ($11.5 \pm 2.3\%$ versus $46.1 \pm 17.3\%$; $P<0.001$).

Tabla 30. Características microbiológicas de *P. aeruginosa* de acuerdo a la virulencia en *C. elegans*.

Variable ^a	No virulentas (CEVS 1-2) (n=7)	Virulentas (CEVS 3-5) (n=31)	P
Fenotipo de resistencia (n [%])			
No MDR	0 (0)	17 (54.8)	0.011
MDR	7 (100)	14 (45.2)	0.011
MLST (n [%])			
ST175	5 (71.4)	0 (0)	<0.001
ST235	0 (0)	12 (38.7)	0.075
Serotipo del antígeno O (n [%])			
O1	1 (14.3)	6 (19.4)	1.000
O4	5 (71.4)	0 (0)	<0.001
O11	0 (0)	14 (45.2)	0.033
Genotipo del SST3 (n [%])			
<i>exoU</i> ⁺ / <i>exoS</i> ⁺	7 (100)	6 (19.4)	<0.001
<i>exoU</i> ⁺ / <i>exoS</i> ⁻	0 (0)	21 (67.7)	0.002
Citotoxicidad, % (media \pm DS)	11.5 \pm 2.3	46.1 \pm 17.3	<0.001

^aSe representan las variables más importantes. MDR: multirresistente; MLST: *multilocus sequence typing*; SST3: sistema de secreción tipo 3; DS: desviación estándar.

DISCUSIÓN

En nuestro hospital, se ha observado un aumento progresivo de aislamientos MDR/XDR de *P. aeruginosa* desde el año 2007 en un contexto epidemiológico de una situación endémica sostenida (73,79), y la impresión clínica es que estos aislamientos producen una infección más grave en el paciente que las cepas sensibles. Más allá del impacto de los factores relacionados con el huésped (comorbilidades subyacentes, gravedad del episodio y foco de la bacteriemia) y el tratamiento (idoneidad del antibiótico, precocidad en su administración y control del foco), la evidencia creciente sugiere que la interacción entre los determinantes propios del patógeno (resistencia antibiótica y virulencia), con diversos efectos en la modulación del *fitness* bacteriano, podría desempeñar un papel importante en la gravedad y el pronóstico del paciente (142,143). De esta manera, las cepas MDR/XDR, en un contexto genético específico y en el escenario de huésped susceptible, podrían presentar una mayor virulencia que las cepas sensibles. En base a esta hipótesis inicial de trabajo, se han planteado una serie de estudios clínicos y experimentales con el objetivo de abordar este problema globalmente y profundizar en la cuestión del impacto real de la resistencia antibiótica en la bacteriemia por *P. aeruginosa*. Desde una aproximación clínica, se han analizado las características epidemiológicas, clínicas y microbiológicas de una amplia cohorte de episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa* durante un periodo de 5 años (2013-2017) en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, así como el impacto de la multirresistencia y la virulencia en el pronóstico de los pacientes. Desde una aproximación experimental se han estudiado, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, las características patogénicas de una colección representativa de cepas de *P. aeruginosa* en función del fenotipo de resistencia y el genotipo de virulencia. Consideramos que algunos de los resultados obtenidos merecen una mayor discusión.

P. aeruginosa constituye una causa importante de bacteriemia en nuestro hospital con una incidencia estimada de 20.6 casos por 100.000 estancias-año, datos congruentes con los reportados en otros estudios (91,222). La cohorte global presenta una edad avanzada, similar a la descrita en otros trabajos de bacteriemia por *P. aeruginosa*, así como un mayor porcentaje de varones (90,91,99,101). Tradicionalmente, la bacteriemia por *P. aeruginosa* se ha relacionado estrechamente con el ámbito hospitalario (90–93). Sin embargo, se ha observado una tendencia al aumento de las bacteriemias de origen extrahospitalario, fundamentalmente a expensas de las asociadas al cuidado sanitario, como se observa en nuestra cohorte (96–98,138). Esto podría explicarse porque en el área sanitaria que corresponde a nuestro hospital se localizan diferentes centros ambulatorios de atención especializada y porque es un centro de referencia para múltiples patologías, con una elevada proporción de pacientes oncohematológicos y sometidos a trasplante, tanto TOS como TCMH. Debido a esto, más de la mitad de los pacientes habían

tenido algún tipo de contacto con el sistema sanitario y la inmensa mayoría había recibido algún tipo de tratamiento antibiótico previo, especialmente carbapenémicos y fluoroquinolonas, lo que concuerda con otros estudios (103,105).

En este sentido, se describe una población con una comorbilidad intermedia, como denota la puntuación en el índice de Charlson (144). Entre las comorbilidades de riesgo de bacteriemia por *P. aeruginosa*, destacan diferentes formas de inmunosupresión como la diabetes mellitus, la neoplasia sólida y hematológica, y el TOS y TCMH, todos ellos implicados como factores de riesgo de adquisición de bacteriemia por *P. aeruginosa* en diferentes estudios (91,101–104). *P. aeruginosa* se comporta como un patógeno oportunista humano, como evidencia la proporción de pacientes con neutropenia severa (<500 células/mm³) incluidos en nuestra cohorte. Cabe destacar que la neutropenia se suma al tratamiento parenteral crónico a través de catéteres vasculares, la frecuente administración de antibióticos de amplio espectro, y otros factores que multiplican el riesgo de bacteriemia por *P. aeruginosa* en esta población. Todo esto, subraya la necesidad de intensificar el esfuerzo en el campo de la prevención con la intención de reducir la incidencia de bacteriemia en estos pacientes.

Como sucede en otras series publicadas, los focos de origen más frecuentes en nuestra cohorte fueron el urinario y el respiratorio, causantes cada uno del 27.6% y 22.6% de las bacteriemias, respectivamente (106–108). En el 10.7% de los casos no se pudo identificar el origen, considerándose como bacteriemias de foco desconocido, cifra inferior a la encontrada por otros autores (89,106). La mayoría de las bacteriemias de foco urinario estaban asociadas a la presencia de catéteres urinarios, mientras que en el foco respiratorio sólo constaba el antecedente de haber recibido VM previa en el 25.5% de los casos. Esto podría explicarse por la elevada proporción de pacientes neutropénicos en nuestra cohorte, capaces de desarrollar infección respiratoria por *P. aeruginosa* sin que necesariamente hayan ingresado previamente en UCI o hayan precisado de VM (223).

La gran mayoría de los episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa* supusieron un deterioro importante de la situación clínica de los pacientes. Así, según el índice de Pitt, se podrían clasificar como graves (Pitt ≥ 2) el 55.6% de los casos (149). El desarrollo de shock séptico tuvo lugar en el 27.2% de los casos, casi siempre dentro de las primeras 48 horas, como describen la mayoría de los estudios que hacen referencia a dicha complicación (91,101,107). Un 19.8% de los pacientes requirió de ingreso en UCI en las primeras 48 horas, estando el 60.4% de los casos directamente relacionados con la bacteriemia. El papel que jugó la bacteriemia en el resto de los ingresos en UCI, así como la necesidad de soporte vasoactivo y VM, fue difícil de delimitar

debido a las diferentes comorbilidades de los pacientes y el carácter retrospectivo de nuestro estudio. En nuestra cohorte, el foco que presentó mayores índices en el *score* de Pitt fue el foco respiratorio, lo que concuerda con que ingresaran en UCI y precisaran de soporte vasoactivo y VM en mayor proporción.

Un 99.6% de los pacientes recibió algún tipo de tratamiento empírico para la bacteriemia. El 66.7% recibió tratamiento de amplio espectro con carbapenémicos o piperacilina-tazobactam. El frecuente uso de antibióticos de amplio espectro en la cohorte no es de extrañar puesto que se trata de una población de alto riesgo para infecciones nosocomiales y por microorganismos MDR/XDR. El tratamiento antibiótico empírico combinado se utilizó en el 47.9% de los casos y mostró mayores probabilidades de ser adecuado en comparación con la monoterapia. La evidencia disponible sugiere que el mayor beneficio de una terapia combinada en las primeras 48-72 horas se deriva de la mayor probabilidad de elegir un agente activo durante la terapia empírica, de disminuir rápidamente la población bacteriana y de evitar la selección de mutantes resistentes (o subpoblaciones resistentes en cepas heterorresistentes) (115,116). El tratamiento empírico fue adecuado en el 65% de los pacientes, similar a los datos obtenidos en otros estudios (20,125,130,222). De entre los pacientes que no recibieron tratamiento empírico adecuado, hubo un 37.6% en los que no se usó ningún antibiótico con actividad frente a *P. aeruginosa*, mientras que en un 62.4% la cepa fue resistente al antibiótico empleado. Por tanto, la magnitud de este hallazgo no es solo una consecuencia directa de la presencia de cepas MDR/XDR sino también de una infección no anticipada por *P. aeruginosa*, lo que podría aumentar el riesgo de una terapia empírica inadecuada.

Del total de las bacteriemias por *P. aeruginosa* incluidas en el estudio, un 38.3% estaban producidas por cepas MDR, y lo que es más importante desde un punto de vista terapéutico, una elevada proporción de estos aislamientos cumplía con el criterio de XDR (93.5% de las cepas MDR y 35.8% del total). Estas cepas fueron resistentes a todos los antibióticos, siendo colistina (100%), amikacina (56.3%) y ceftazidima-avibactam (49.4%) los agentes que presentaron mayor actividad. En general, la prevalencia actual de cepas MDR está en un rango del 15-30%, según el área geográfica (162–166). Además, en consonancia con nuestros hallazgos, se ha observado que una proporción significativa de las cepas MDR cumple criterios de XDR, lo que restringe aún más las opciones de tratamiento antibiótico disponibles. Así, por ejemplo, en un estudio multicéntrico reciente de infecciones por *P. aeruginosa* en el que participaron 51 hospitales españoles, Del Barrio-Tofiño *et al.* (166) encontraron que el 26% de los aislamientos eran MDR y el 65% de ellos (17% del total) cumplía los criterios de XDR, siendo la mayoría únicamente sensibles a colistina y/o amikacina. Peña *et al.* (20) reportaron resultados comparables en un

estudio multicéntrico español de episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa*, en el que 28% de los aislamientos era MDR y el 52% de los mismos (15% del total) cumplía los criterios de XDR, siendo la mayoría de ellos sensibles solo a colistina y/o amikacina.

A la hora de evaluar la resistencia antibiótica en *P. aeruginosa* hay que tener en cuenta que en las últimas décadas se han utilizado diferentes definiciones del concepto de multirresistencia, aunque la definición de consenso que probablemente se utiliza más ampliamente en la actualidad es la publicada por Magiorakos *et al.* (161). Si bien esta propuesta ha sido útil para la armonización de las definiciones de los perfiles de resistencia MDR/XDR/PDR, ésta presenta algunas limitaciones que deben considerarse. En primer lugar, estas definiciones pueden variar dependiendo de si se usan los puntos de corte de EUCAST o CLSI. En segundo lugar, la aplicación integral de estas definiciones está limitada por la falta de puntos de corte clínicos (tanto en EUCAST como en CLSI) para fosfomicina. De igual forma, los puntos de corte de EUCAST para aztreonam consideran a *P. aeruginosa* intrínsecamente no sensible a este agente y, por lo tanto, pueden existir controversias a la hora de aplicar estas definiciones. Finalmente, la definición actual no considera algunos agentes antipseudomónicos recientemente introducidos, como ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam.

Sin duda, uno de los aspectos clave a tener en cuenta respecto a la resistencia antibiótica en *P. aeruginosa*, tanto desde el punto de vista epidemiológico como terapéutico, es si ésta está mediada por determinantes de resistencia transferibles. La creciente prevalencia de cepas MDR/XDR resulta de la conjunción de la extraordinaria capacidad de *P. aeruginosa* para desarrollar resistencia frente a la mayoría de los antibióticos disponibles mediante la selección de mutaciones cromosómicas, con la cada vez más frecuente adquisición de determinantes de resistencia transferibles (51,52,55). Entre estos determinantes cabe destacar por su importancia clínica los genes de las β -lactamasas de mayor espectro hidrolítico, como son las carbapenemasas. Desafortunadamente, la mayoría de las cepas MDR/XDR procedentes de nuestro hospital fueron positivas para la producción de carbapenemasas, en concreto una carbapenemasa de clase A tipo GES-5 y una carbapenemasa de clase B (MBL) tipo VIM-2. Este es un dato alarmante, ya que por un lado el riesgo de diseminación horizontal del mecanismo de resistencia es mucho mayor y por otro porque, al estar implicada la producción de carbapenemasas, y particularmente las MBL, las nuevas combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasa, ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam, carecen de actividad en estas cepas (132,133,135). Además, la alta prevalencia de cepas de *P. aeruginosa* productoras de carbapenemasa en nuestro centro difiere de los datos publicados de los últimos estudios multicéntricos nacionales, situando la prevalencia en un 1-3% (130,166). Esto subraya

la necesidad de intensificar el esfuerzo en el campo de la vigilancia epidemiológica de *P. aeruginosa* MDR/XDR en nuestra institución.

Los estudios genotípicos realizados en este trabajo demostraron la existencia de dos clones mayoritarios entre las cepas con fenotipo MDR/XDR, de forma que prácticamente la totalidad de las cepas con perfil de resistencia XDR estaban representadas por los clones de alto riesgo ST175 y ST235, lo que demuestra una situación endémica en nuestra institución. La diseminación intrahospitalaria originando situaciones epidémicas/endémicas de determinadas cepas de *P. aeruginosa* MDR/XDR asociadas a los denominados clones de alto riesgo juega sin duda un papel clave en las crecientes dimensiones de este problema (55,178–180). El clon de alto riesgo ST175 estuvo asociado a la presencia de la carbapenemasa tipo VIM-2, mientras que el clon ST235 fue portador de la carbapenemasa tipo GES-5. En línea con esto, estudios previos realizados por nuestro grupo demostraron que la mayoría de los aislamientos de *P. aeruginosa* MDR/XDR analizados en nuestro hospital durante el periodo 2007-2010 pertenecían a los clones de alto riesgo diseminados internacionalmente, siendo el ST175 y el ST235 los clones más prevalentes (73,79). En estos estudios, el clon de alto riesgo ST175 (productor de carbapenemasa tipo VIM-2) fue responsable del 56.8% de estos aislamientos de *P. aeruginosa*, dando lugar a una situación de endemidad en nuestro hospital; por otro lado, el clon ST235 (portador de β -lactamasa y carbapenemasa tipo GES-1/GES-5, entre otros mecanismos) causó un brote epidémico en el servicio de Hematología, que fue resuelto entonces pero que ha reemergido actualmente para coexistir en diferentes unidades del hospital con el clon ST175. Asimismo, en otros dos estudios recientes de epidemiología molecular de *P. aeruginosa* y resistencia antimicrobiana en España, del Barrio-Tofiño *et al.* (165,166) encontraron que todos los aislamientos de *P. aeruginosa* recuperados de nuestro centro también pertenecían al clon de alto riesgo ST175 y ST235. En estos dos estudios anteriores, el mecanismo de resistencia a β -lactámicos subyacente en el fenotipo XDR fue principalmente la adquisición horizontal de β -lactamasas y carbapenemasas (GES-1, GES-5 y VIM-2) en lugar de una combinación de mutaciones cromosómicas. La asociación entre los clones de alto riesgo y los mecanismos de resistencia adquiridos horizontalmente es preocupante. Un estudio reciente sobre el análisis genómico de cepas pertenecientes al clon ST235 sugirió que la presencia específica en estas cepas de DprA (gen *dprA*), un determinante involucrado en la recombinación homóloga, sea probablemente el responsable de la elevada capacidad de este clon de alto riesgo para adquirir y mantener elementos de resistencia exógenos en tasas más altas que otros clones de *P. aeruginosa* (179).

Considerando nuestra experiencia y la literatura reciente revisada (52,115,116), se podrían definir algunas recomendaciones terapéuticas generales basadas en los perfiles de resistencia

MDR/XDR de *P. aeruginosa* más prevalentes en nuestra institución (**Tabla 31**). Así, ante un aislamiento de *P. aeruginosa* sensible únicamente a ceftolozano-tazobactam, ceftazidima-avibactam, amikacina y colistina, es probable que el mecanismo de resistencia subyacente sea mutacional a través de la combinación de diferentes mecanismos (hiperproducción de AmpC, pérdida de porina OprD, etc.), y en este caso las opciones de tratamiento pueden ser ceftolozano-tazobactam, ceftazidima-avibactam, amikacina o colistina. Por el contrario, ante un aislamiento de *P. aeruginosa* únicamente sensible a amikacina y colistina, se debe sospechar la presencia de una carbapenemasa tipo MBL (VIM-2), y en este caso las opciones terapéuticas se limitan al uso de aztreonam, amikacina y asociaciones de aztreonam con ceftazidima-avibactam con o sin colistina. Por último, si el aislamiento de *P. aeruginosa* es únicamente sensible a ceftazidima-avibactam y colistina, podría ser una cepa productora de carbapenemasa de clase A (GES-5), y en este caso se puede utilizar ceftazidima-avibactam y/o colistina.

Tabla 31. Opciones terapéuticas sugeridas según los perfiles de resistencia de *P. aeruginosa*.

Perfil de resistencia	Mecanismo de resistencia	Clon de alto riesgo	Opción terapéutica ^a
PIP/TZ R, CAZ R, FEP R, ATM R, MER R, TOL/TZ S, CAZ/AVI S, AMI S, COL S	Mutacional (hiperexpresión de AmpC, pérdida de OprD, etc.)	--	COL, AMI, TOL/TZ, CAZ/AVI
PIP/TZ R, CAZ R, FEP R, ATM I ^b , MER R, TOL/TZ R, CAZ/AVI R, AMI S, COL S	Carbapenemasa de clase B o MBL (VIM-2)	ST175	COL, AMI, ATM, CAZ/AVI+ATM
PIP/TZ R, CAZ R, FEP R, ATM R, MER R, TOL/TZ R, CAZ/AVI S, AMI R, COL S	Carbapenemasa de clase A (GES-5)	ST235	COL, CAZ/AVI

CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; PIP/TZ: piperacilina-tazobactam; ATM: aztreonam; MER: meropenem; AMI: amikacina; COL: colistina; TOL/TZ: ceftolozano-tazobactam; CAZ/AVI: ceftazidima-avibactam; R: resistente; I: intermedio; S: sensible; MBL: metalo- β -lactamasa; ST: secuencia tipo. ^aEn infecciones graves debe considerarse la administración de β -lactámicos en infusión continua o extendida y/o la combinación con colistina o amikacina. ^bCMI₉₀ a aztreonam de 4 mg/L. Adaptado de Horcajada *et al.* (52).

Por lo tanto, la utilidad de las nuevas combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasa, ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam, en aislamientos de *P. aeruginosa* MDR/XDR en nuestra institución se quedaría relegada a situaciones concretas. Dependiendo de los mecanismos de resistencia subyacentes, ceftolozano-tazobactam podría ser una buena opción para el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* MDR/XDR no productoras de carbapenemasas. Por otro lado, ceftazidima-avibactam podría ser la mejor opción para los

aislamientos de *P. aeruginosa* MDR/XDR portadores de carbapenemasa de clase A (GES-5) o aquellas no productoras de carbapenemasas. La asociación de ceftazidima-avibactam con aztreonam podría ser una posible opción para el tratamiento de *P. aeruginosa* productora de MBL (VIM-2). Estudios previos han evaluado su eficacia *in vitro* en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* productores de MBL mostrando un efecto sinérgico (224,225). El avibactam es un inhibidor muy potente de las β -lactamasas de clase A y C, mientras que aztreonam es estable frente a las MBL. Así, la adición de avibactam protege a la ceftazidima y al aztreonam de la degradación enzimática de las BLEE y las cefalosporinasas, lo que conduce a una disminución de la CMI de estos antibióticos.

En el análisis univariante realizado en nuestra cohorte se encontraron varios factores asociados a un mayor riesgo de multirresistencia. El antecedente de colonización por una cepa de *P. aeruginosa* MDR/XDR mostró estar relacionado con la probabilidad de aislar una cepa MDR en el hemocultivo, siendo similar a lo observado en otros estudios (105,226). También se ha postulado que la situación inmunológica puede tener un papel importante en este sentido (145). De hecho, en nuestra cohorte se encontró una mayor frecuencia de aislamientos MDR/XDR entre los pacientes con neoplasias hematológicas y neutropenia severa. El uso de dispositivos también se ha asociado a un mayor riesgo de aparición de resistencia antibiótica, en gran parte por la formación de *biofilms* en las superficies inertes (227). En nuestra cohorte, se observó un mayor uso de catéteres vasculares entre los pacientes infectados por cepas MDR/XDR. El uso previo de carbapenémicos y fluoroquinolonas fue otro de los factores de riesgo para el desarrollo de cepas MDR/XDR, lo que coincide con los datos publicados en otros estudios (228–230). Esto podría explicarse en parte por la extendida utilización de las fluoroquinolonas como profilaxis en los pacientes neutropénicos en nuestro centro. Las fluoroquinolonas son sustrato universal de las bombas de expulsión activa presentes en la pared celular de *P. aeruginosa*. Estas bombas son capaces de eliminar a la vez varias familias de antibióticos (β -lactámicos y aminoglucósidos), lo que explica que la exposición a fluoroquinolonas pueda favorecer el desarrollo de multirresistencia en *P. aeruginosa* (51,52,62). Durante el periodo de estudio, y promovido por la evidencia publicada (22,23), se estableció a nivel hospitalario un cambio en el protocolo de profilaxis antibiótica en el paciente neutropénico dirigido a disminuir la incidencia de colonización/infección por cepas MDR/XDR de *P. aeruginosa* en esta población. Dicha estrategia podría colaborar en disminuir la proporción de pacientes neutropénicos con infecciones/colonizaciones por *P. aeruginosa* MDR/XDR.

Otras características microbiológicas de *P. aeruginosa* exploradas en la presente investigación fueron el genotipo del SST3, el serotipo O y el TP del hemocultivo. Como era de esperar, los

genes *exoT* y *exoY* se detectaron en la mayoría de las cepas, pero la presencia de los genes *exoS* y *exoU* fue mutuamente excluyente. En general, el 76.1% de las cepas presentaron el genotipo *exoS*⁺ y el 20.6% el genotipo *exoU*⁺. Por lo tanto, nuestros hallazgos concuerdan con estudios previos que demuestran que el genotipo *exoU*⁺, que varía entre el 10-40%, es menos frecuente que el genotipo *exoS*⁺ (60-90%) entre las cepas clínicas de *P. aeruginosa* (20,26). Por otro lado, mediante el empleo de antisueros comerciales que cubren 16 (O1-O16) de los 20 antígenos específicos de *P. aeruginosa* (219), se identificó que hasta el 12.3% de los aislamientos fueron no tipables, siendo este un problema menor para la aplicación de este sistema de tipificación. Esta proporción de aislamientos no tipables fue de hecho menor que la documentada en un estudio previo en el que se observaron un 35% de aislamientos clínicos no tipables (231). Esto probablemente se deba a la amplia representación de aislamientos de fibrosis quística, que, en general, suelen ser no tipables debido a la pérdida del antígeno O como parte del proceso de adaptación para su persistencia en infecciones crónicas. Los serotipos O1, O4, O6, y O11 fueron los más frecuentes entre los aislamientos clínicos de bacteriemia por *P. aeruginosa* en nuestro centro. Aunque la comparación con otros estudios previos no es sencilla debido al pequeño número de aislamientos incluidos o al sesgo de selección de las cepas (MDR, infecciones crónicas, etc.), estos cuatro serotipos parecen ser los más frecuentes a nivel mundial (39,40). Finalmente, nuestro estudio mostró una mediana del TP del hemocultivo de 16 horas con un 92.6% y 98.8% de los episodios positivos dentro de las primeras 24 y 36 horas, respectivamente. Estos resultados son congruentes con los trabajos publicados por Tang *et al.* (158) y Willmann *et al.* (159) en los que se incluyeron 139 y 120 episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa* en dos hospitales terciarios con unas medianas de TP del hemocultivo de 14.6 y 15 horas, respectivamente. Algo aún más relevante, es que, en nuestra cohorte, ninguno de los episodios de bacteriemia producidos por cepas de *P. aeruginosa* MDR tuvo un TP del hemocultivo mayor de 36 horas. El potencial impacto de estos resultados es muy importante para apoyar las estrategias de desescalada temprana de antibioterapia empírica en los hospitales especialmente en pacientes estables, lo que condicionaría una disminución significativa de la presión antimicrobiana. Además, nuestros hallazgos proporcionan evidencia de que aquellos pacientes que no tienen hemocultivos positivos en las primeras 24-36 horas, probablemente no tendrán una bacteriemia por *P. aeruginosa* que requiera de tratamiento antipseudomónico.

La presente experiencia refuerza el concepto actual de que la bacteriemia por *P. aeruginosa* es una entidad grave asociada a una elevada mortalidad con tasas cercanas al 30%, siendo ésta incluso superior a la producida por otros microorganismos (96,106,139–141). En nuestra cohorte, la mortalidad global precoz fue del 20.2%, mientras que la mortalidad global tardía fue

del 33.3%. La gran mayoría de las publicaciones que abordan este aspecto se centran en población general, cuya mortalidad se sitúa en torno al 20-51% (21,91,97,103,124,125,130,137). Una de las principales características observadas en las curvas de supervivencia es el alto porcentaje de pacientes que fallecen en los primeros días tras el episodio de bacteriemia, especialmente en las primeras 48 horas. Esta distribución es congruente con la mayoría de los estudios, en los que el curso de los episodios fatales transcurre de forma rápidamente progresiva, produciéndose el fallecimiento dentro de los primeros días, considerándose ésta la mortalidad que más puede atribuirse al episodio de bacteriemia (20,130,151). Sin embargo, y a la luz de los resultados de este trabajo, parece razonable considerar que la bacteriemia por *P. aeruginosa* también juega un papel importante en la mortalidad tardía, ya que la situación crítica que supone la mayoría de episodios de bacteriemia muy probablemente contribuya al deterioro de la situación basal de los pacientes y acelere el curso fatal de su evolución. Los datos del presente trabajo demuestran que este pronóstico clínico adverso es el resultado de factores dinámicos que operan a nivel del microorganismo, el huésped y el tratamiento antibiótico. Estos incluyen la resistencia antibiótica y la virulencia del patógeno, la inmunidad del huésped y la relación huésped-patógeno frente a la infección, así como la idoneidad del tratamiento antibiótico. A medida que estos factores interactúan, el cuadro clínico evoluciona, con el desafortunado resultado, en algunos casos, de un incremento en la mortalidad (142,143).

Con respecto al patógeno, se debe abordar tanto el desarrollo de la resistencia antibiótica como su virulencia para tener una perspectiva completa del problema clínico. Se ha planteado la hipótesis de que las bacteriemias causadas por cepas resistentes a los antibióticos conducen a un peor pronóstico que las causadas por cepas sensibles, aunque el impacto real de la multirresistencia sigue siendo un tema controvertido. Estos resultados contradictorios podrían deberse en parte a la dificultad de dilucidar la influencia de otros factores en el pronóstico de estas infecciones, tales como las comorbilidades subyacentes del huésped, la gravedad de la presentación clínica, el foco de la bacteriemia, el tratamiento antibiótico o los determinantes de virulencia bacteriana. Los estudios al respecto presentan algunos sesgos (definiciones poco consistentes de multirresistencia, diferencias en la población de estudio, tamaño de muestra insuficiente...), que impiden extraer conclusiones definitivas. Además, una gran parte de estos estudios están centrados únicamente en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, pero no específicamente en aislamientos MDR/XDR, en los cuales existen pocos antibióticos activos disponibles y son más propensos a vincularse a clones de alto riesgo.

Tras el ajuste por posibles factores de confusión, se encontró que los pacientes con bacteriemia producida por aislamientos de *P. aeruginosa* MDR/XDR tenían el doble de probabilidades de

fallecer en comparación con los pacientes infectados con cepas sensibles. Varios estudios han identificado una asociación entre la resistencia a los antibióticos y un pronóstico clínico adverso (20,125,154–156,187–189). Sin embargo, el impacto real de la multirresistencia no está tan bien establecido. Las implicaciones biológicas de la resistencia antibiótica sobre la virulencia de *P. aeruginosa* es actualmente un tema de máximo interés. En general, se asume que la adquisición de mecanismos de resistencia antibiótica se acompaña de una pérdida de *fitness* y una disminución de la virulencia, lo que reduce la gravedad de la infección y, en consecuencia, la mortalidad (33,194,195). Sin embargo, este efecto puede variar significativamente dependiendo del contexto genético específico de las cepas involucradas (142,182,184). En línea con esta hipótesis, la presente investigación proporciona evidencia de que la virulencia de las cepas de *P. aeruginosa* puede diferir entre cepas con un fenotipo de resistencia similar. Así, dentro de las cepas MDR/XDR, el clon de alto riesgo ST175 se caracterizó por su baja virulencia y repercusión clínica, mientras que el clon de alto riesgo ST235 mostró un fenotipo hipervirulento. Esto probablemente pueda deberse a que la virulencia de *P. aeruginosa* no solo depende de la pérdida de *fitness* bacteriano, sino también de la presencia de algunos determinantes de virulencia como el genotipo del SST3 y el serotipo del antígeno O del lipopolisacárido.

En consecuencia, encontramos que el genotipo *exoU*⁺ y el serotipo O11 fueron factores de riesgo de mortalidad, independientes de otras variables, incluida la multirresistencia. Como se ha comentado previamente, el genotipo del SST3 se considera uno de los determinantes de virulencia más importantes de *P. aeruginosa* (11,26). De las cuatro proteínas efectoras del SST3 (ExoS, ExoT, ExoU y ExoY), ExoU es la que se ha asociado a un peor pronóstico tanto en investigaciones clínicas como experimentales (18–21,23,186). Así, en un estudio multicéntrico español, Peña *et al.* (20) demostraron con elegancia que el genotipo *exoU*⁺ asociado a ciertos fenotipos de resistencia constituye un predictor independiente de mortalidad precoz en pacientes con bacteriemia por *P. aeruginosa*. Además, datos recientes demuestran que el genotipo *exoU*⁺ se asocia con una mayor probabilidad de desarrollar neumonía en pacientes con cultivos respiratorios positivos para *P. aeruginosa* (232). Por otro lado, el serotipo del antígeno O se ha utilizado para la clasificación de los aislamientos de *P. aeruginosa* y desempeña un papel importante a nivel estructural e inmunógeno (38,219). Entre los diversos serotipos de *P. aeruginosa*, el serotipo O11 es el más prevalente a nivel mundial y se ha relacionado con un peor pronóstico en la neumonía nosocomial (39–42). Desafortunadamente, en nuestra cohorte, la mayoría de las cepas con serotipo O11 también presentaban el genotipo *exoU*⁺, por lo que a la luz de estos hallazgos es difícil distinguir si este serotipo específico se comporta como un factor

de virulencia directo o si es solo un marcador subrogado de un aislamiento virulento de *P. aeruginosa*.

Una de las aportaciones principales de este trabajo es que es uno de los primeros que evalúa la interacción entre la multirresistencia, el genotipo del SST3 y el serotipo del antígeno O, y su impacto en el pronóstico de los pacientes con bacteriemia por *P. aeruginosa*. Así, de acuerdo con estudios previos, se observó que los aislamientos pertenecientes al serotipo O4 y O11 exhibieron principalmente un fenotipo MDR/XDR y estuvieron asociados en mayor frecuencia con los genotipos de virulencia *exoU/exoS⁺* y *exoU⁺/exoS⁻*, respectivamente (39,40,233,234). Dada esta conexión entre resistencia antibiótica y virulencia, el aislamiento de cepas de *P. aeruginosa* con serotipo O4 y O11 puede ser significativo para el pronóstico del paciente y para la elección de la antibioterapia empírica. En nuestro entorno, el serotipo del antígeno O podría ser una herramienta simple y útil para la identificación presuntiva rápida de aislamientos MDR/XDR únicamente sensibles a colistina, amikacina, y algunos de ellos a ceftazidima-avibactam. Por otro lado, la identificación de serotipos distintos de O4 u O11 disminuiría significativamente las posibilidades de hallar un aislamiento MDR/XDR. Si bien esta experiencia se refiere sólo a nuestro hospital, la coincidencia de los serotipos O4 y O11 con los clones de alto riesgo ST175 y ST235 podría hacer que estas observaciones sean de interés en muchas otras localizaciones. Asimismo, en un estudio nacional reciente que incluyó 1445 aislamientos de *P. aeruginosa*, Del Barrio Tofiño *et al.* (40) encontraron que los serotipos O4 y O11 están vinculados al fenotipo MDR/XDR de los clones de alto riesgo ST175 y ST235, respectivamente.

La fortaleza del análisis multivariante de nuestro trabajo se ve reforzada por su ajuste con otras variables relevantes asociadas al huésped y al tratamiento antibiótico que también influyen en el pronóstico del paciente con bacteriemia por *P. aeruginosa*. La neutropenia severa es una entidad grave que generalmente coexiste con neoplasias hematológicas subyacentes y que fácilmente da paso a una infección invasiva por *P. aeruginosa*, con desenlace fatal en muchos de los casos (103,107,108,145). Esto pone de manifiesto la gran importancia de los neutrófilos en la defensa contra *P. aeruginosa* (89). La gravedad de la presentación clínica, especialmente en el contexto de un foco de origen respiratorio, tiene un impacto bien documentado sobre la mortalidad de los pacientes con bacteriemia por *P. aeruginosa* (97,124,125,146,147). El índice de Pitt refleja la gravedad de los episodios de bacteriemia, por lo que es esperable que sea uno de los parámetros con mayor efecto sobre la mortalidad global, como se ha visto en diferentes estudios (91,97,150). Igualmente, el foco respiratorio frecuentemente favorece el desarrollo de shock séptico, también implicado en la mortalidad (98,124,125,139,146,147). La adquisición nosocomial también fue un predictor independiente de mortalidad tardía, y probablemente se

erige como un marcador subrogado de la complejidad del paciente. Por otro lado, la terapia empírica inadecuada también se asoció a un mal pronóstico, lo que probablemente refleja el limitado número de opciones de tratamiento antibiótico disponibles en el contexto de la elevada proporción de cepas MDR/XDR productoras de carbapenemasa encontradas en nuestro hospital. Una de las principales consecuencias de la multirresistencia es la dificultad para seleccionar un tratamiento empírico apropiado. En este sentido, los pacientes con infecciones producidas por cepas de *P. aeruginosa* MDR/XDR tienen un mayor riesgo de recibir una terapia antibiótica inicial inadecuada. El retraso en la terapia antibiótica efectiva se asocia con peores resultados y tasas de mortalidad más altas en pacientes con bacteriemia por *P. aeruginosa* (97,124–127,150,154). Sin embargo, existen algunos estudios donde no se ha podido demostrar una asociación estadísticamente significativa con la mortalidad (21,130,156,160).

Los coeficientes de *odds ratio* también se ajustaron por el TP de los hemocultivos. Aunque este parámetro puede verse influenciado por el volumen de sangre inoculado en la botella del hemocultivo o por un retraso en el tiempo de procesamiento de la muestra, la extracción de hemocultivos para el diagnóstico de bacteriemia se ha convertido en un procedimiento estándar, fácil y automatizado. Desde una perspectiva general, el TP del hemocultivo es un marcador subrogado del inóculo bacteriano, lo que significa que los episodios con una alta carga bacteriana darán lugar hemocultivos positivos antes que las infecciones de bajo inóculo. La positivización del hemocultivo en las primeras 13 horas se ha implicado en la mortalidad de los pacientes con bacteriemia por *P. aeruginosa*, algo que se pone en relación con la carga bacteriana en sangre (158). En nuestro estudio se demostró que el TP del hemocultivo se asociaba significativamente con la tasa de mortalidad, de forma inversamente proporcional.

Otra de las contribuciones de la presente investigación es la posible correlación existente entre la multirresistencia y la virulencia de *P. aeruginosa* en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. Como se ha comentado previamente, un aspecto a tener en cuenta es el supuesto coste biológico asociado a la resistencia antibiótica, que cuenta con un elevado número de referencias en la literatura, la mayoría de las cuales habla de una alteración del *fitness* y/o la virulencia (184,191–193). En este sentido, se encontró que las cepas sensibles estaban asociadas a una mayor citotoxicidad y virulencia en el modelo de *C. elegans*, en comparación con los aislamientos MDR/XDR. Estos hallazgos son consistentes con estudios recientes que sugieren que los patógenos que adquieren mecanismos de resistencia antibiótica incurren en compensaciones fijas que comprometen su potencial patogénico (33,194–196). Sin embargo, otros autores han desafiado este punto de vista, proporcionando datos en los que la resistencia antibiótica aumenta el *fitness* bacteriano durante la infección. De hecho, algunos trabajos han

identificado que las cepas MDR pueden desarrollar mecanismos compensatorios o supresores que les permiten recuperar su *fitness* basal (184,191,192,198). Otros estudios han encontrado que algunos clones de alto riesgo pueden ser tan virulentos como las cepas sensibles, a pesar de su extraordinaria capacidad de adquirir mecanismos de resistencia, lo que sugiere que la patogenicidad depende no solo del coste biológico asociado a la resistencia, sino también de la presencia de ciertos determinantes de virulencia (24,186,207,208). Así, el presente trabajo demostró que la virulencia de *P. aeruginosa* puede variar entre cepas con fenotipo MDR/XDR como consecuencia de la asociación de determinados factores de virulencia con clones de alto riesgo específicos.

En este sentido, se observó que la virulencia de las cepas pertenecientes al clon de alto riesgo ST235 fue similar a la de las cepas sensibles tanto en su capacidad para lisar las células epiteliales como en su letalidad en el modelo de *C. elegans*. En contraposición, la citotoxicidad y la letalidad en el nematodo de las cepas pertenecientes al clon de alto riesgo ST175 fue particularmente baja. Este distinto comportamiento ilustra bien que la virulencia de los clones epidémicos de alto riesgo es un aspecto importante a tener en cuenta a la hora de abordar el impacto de la multirresistencia. La evidencia actual sugiere que la virulencia de los clones de alto riesgo es variable, siendo el clon ST235 el que presenta un comportamiento más virulento (**Tabla 32**) (52). Esto probablemente se puede explicar por el hecho de que la mayor virulencia de estas cepas reside principalmente en su potente citotoxicidad, basada en la producción de la exotoxina ExoU, presente únicamente en el clon ST235 (18,55). Esto explicaría por qué el clon de alto riesgo ST235 (genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻) parece ser particularmente virulento, mientras que la virulencia del clon ST175 (genotipo *exoU*⁻/*exoS*⁺) es especialmente baja (20,22–24,186,207,208). Por lo tanto, se puede inferir que la alta prevalencia del clon de alto riesgo ST235 particularmente virulento en nuestra institución podría explicar, en parte, el impacto perjudicial del fenotipo MDR/XDR en la mortalidad observada en nuestros pacientes.

Tabla 32. Características de los tres principales clones de alto riesgo de *P. aeruginosa*.

Característica	ST111	ST175	ST235
Serotipo O	O12	O4	O11
SST3	ExoS ⁺ /ExoU ⁻	ExoS ⁺ /ExoU ⁻	ExoS ⁻ /ExoU ⁺
Virulencia ^a	++	+	+++
Distribución mundial	++	+	+++
Resistencia mutacional	++	+++	++
Resistencia transferible	++	+	+++

^aCapacidad de producir infecciones graves y/o mayor mortalidad en infecciones agudas según resultados con modelos animales y experiencia clínica. SST3: sistema de secreción tipo 3. Adaptado de Horcajada *et al.* (52).

Nuestros modelos experimentales muestran que, efectivamente, la presencia del genotipo *exoU*⁺ se asocia a niveles elevados de citotoxicidad y a una mayor letalidad en el modelo de *C. elegans*. Ocurre de forma similar con la presencia del serotipo O11. Estos hallazgos son consistentes con estudios experimentales previos que señalan una virulencia incrementada del genotipo *exoU*⁺ y el serotipo O11 (18,24,42,186,207,208). Así, en un estudio reciente Howell *et al.* (18) demostraron que el gen *exoU* se expresa y la proteína efectora ExoU se produce de forma temprana en un modelo de neumonía en ratón. Esta exotoxina posee actividad fosfolipasa A₂ que causa una rápida interrupción de la membrana plasmática y necrosis celular, promoviendo la trans migración bacteriana al agredir a las células epiteliales (13–15). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que no todas las cepas de *P. aeruginosa* producen las exotoxinas del SST3, siendo éstas menos virulentas (19,21,232). En otro modelo murino de infección pulmonar aguda, se descubrió que el serotipo O11 estaba asociado con una mayor lesión pulmonar, probablemente relacionada con la presencia de ExoU (42).

Asimismo, se deben tener en consideración otros factores que impulsan el éxito de los clones de alto riesgo. Un estudio reciente de Mulet *et al.* (185) sugiere que los principales clones epidémicos (ST111, ST175 y ST235) se caracterizan por un conjunto definido de marcadores biológicos que incluyen la reducción de los tres tipos de motilidad bacteriana (*swarming*, *twitching* y *swimming*) y de la producción de pigmentos (pioverdina y piocianina). Por otro lado, estos clones epidémicos mostraron una mayor tasa de mutaciones espontáneas y mayor formación de *biofilms*. Por lo tanto, hay similitudes entre estos marcadores biológicos definidos para los clones de alto riesgo de *P. aeruginosa* y aquellos típicamente resultantes de la adaptación a la infección crónica. Así, la formación de *biofilms* representa un mecanismo por el que los fenotipos resistentes son seleccionados juntamente con sus contrapartidas fisiológicas. Las bacterias que crecen en dichos *biofilms* son más resistentes a la acción de los antibióticos que las células planctónicas, pero, a cambio, gran parte de los factores de virulencia se ven afectados negativamente; circunstancias que en el ámbito de la infección invasiva aguda probablemente serían negativas para la bacteria (33).

Este fenómeno se ilustra bien en nuestra cohorte, ya que el hecho de que solo una baja proporción (18.4%) de los aislamientos clínicos mostrara un fenotipo de baja virulencia (CEVS 1-2) en el modelo de *C. elegans* sugiere que las infecciones invasivas podrían estar producidas, de por sí, por cepas particularmente virulentas (toxinas del SST y cadenas largas del antígeno O del lipopolisacárido). El lipopolisacárido de *P. aeruginosa*, desempeña un papel importante, además de en la organización de la membrana externa, en la resistencia a la inmunidad del huésped, de forma que variaciones en dicha estructura afectan a la resistencia a los péptidos microbianos.

Así pues, en infecciones agudas, el lipopolisacárido suele ser “liso” (con cadenas largas del antígeno O) y protege a *P. aeruginosa* frente a la acción del complemento. Sin embargo, cuando se produce una infección crónica, habitualmente se seleccionan mutaciones en diferentes genes (*wbpL*, *waal*, etc.), haciéndose más “rugoso” (con acortamiento y pérdida parcial o total del antígeno O) y más sensible a la acción del complemento, pero probablemente menos inmunógeno (38,219).

Otro aspecto importante explorado en los estudios experimentales aquí presentados fue la posible asociación entre los ensayos *in vitro* e *in vivo*. En este sentido, se encontró que la mayor virulencia (CEVS 3 a 5) o la menor virulencia (CEVS 1 a 2) de las cepas de *P. aeruginosa* en el modelo de *C. elegans* se correlacionaba significativamente con la presencia del fenotipo MDR y no MDR, los genotipos *exoU*⁺ y *exoS*⁺, los serotipos O4 y O11, y con el clon de alto riesgo ST175. Además, se demostró que las cepas más citotóxicas presentaban una mayor virulencia en el modelo de *C. elegans*, pudiendo ser éste su principal mecanismo patogénico. Por lo tanto, nuestros resultados respaldan y amplían estudios recientes que sugieren una asociación entre el fenotipo de resistencia, los clones de alto riesgo y la virulencia (186,207,208), y determinan un paso importante en la comprensión de la interacción entre la resistencia y la virulencia en infecciones invasivas por *P. aeruginosa*.

Este trabajo presenta una serie de fortalezas metodológicas que merecen ser destacadas. En primer lugar, la investigación clínica incluye uno de los tamaños muestrales más grandes publicados de bacteriemia por *P. aeruginosa*, eliminando así los sesgos de muchos estudios con tamaños muestrales pequeños, que reducen el poder estadístico impidiendo así poder sacar conclusiones confiables. En segundo lugar, se han aplicado definiciones estandarizadas de multirresistencia, minimizando así las limitaciones encontradas en estudios previos. En tercer lugar, se realizó un análisis estadístico de amplio alcance para controlar las variables de confusión, incluido un subanálisis de los factores del patógeno, con consistencia de los resultados en el ajuste multivariante. Finalmente, se ha realizado una completa caracterización microbiológica y molecular de todas las cepas incluidas en este trabajo, que ha permitido conocer las distintas características fenotípicas y genotípicas de los aislamientos invasivos de *P. aeruginosa*. Además, algunos de los parámetros microbiológicos evaluados, como el serotipo del antígeno O, están habitualmente disponibles en la rutina asistencial y su determinación no precisa de un equipamiento complejo ni de una carga de trabajo suplementaria en el laboratorio de Microbiología. Consideramos que después de su validación local, puede ser una herramienta útil en la práctica clínica tanto para guiar el tratamiento empírico antipseudomónico como para ejercer medidas de control de las infecciones hospitalarias por *P. aeruginosa*.

La presente investigación también adolece de ciertas limitaciones que han de considerarse. En cuanto a la investigación clínica, cabe destacar que la mayor parte de los datos se obtuvieron retrospectivamente a través de la historia clínica electrónica y, por lo tanto, son más susceptibles de posibles sesgos. Además, la presente investigación se ha llevado a cabo en un único hospital y los resultados pueden no ser necesariamente extrapolables a otros centros con una epidemiología diferente, por lo que nuestros hallazgos deberían ser validados externamente. Tampoco se tuvieron en cuenta algunas variables como la dosis y/o el tipo de administración de la antibioterapia empírica (monoterapia, terapia combinada...), por lo tanto, su impacto en el pronóstico de la bacteriemia podría haberse pasado por alto. En cuanto a la investigación experimental, el número relativamente pequeño de cepas de *P. aeruginosa* a estudio ofrece una posibilidad sustancial de sesgo estadístico y no permite realizar análisis multivariantes, de modo que estos resultados deben interpretarse con cautela. Además, la selección inicial de los aislamientos pretendió ser representativa del problema clínico observado y, por lo tanto, se basó no sólo en el fenotipo de resistencia sino también en los resultados del análisis del MLST, genotipo del SST3 y del serotipo del antígeno O. Al hacerlo, se han incluido más aislamientos de ciertos perfiles MDR/XDR asociados a los clones de alto riesgo ST175 y ST235. Sin embargo, consideramos que la inclusión de varios de estos aislamientos aseguró que hubiese tanta variabilidad como fuera posible y permitió un análisis estadístico más robusto. Por otro lado, la ausencia de estudios de secuenciación del genoma completo y transcriptómicos no han permitido identificar otros posibles factores bacterianos responsables de las diferencias en el comportamiento patogénico y la variabilidad de la expresión génica entre las cepas, aspectos que tendrán que ser evaluados en futuros estudios.

Según todo lo descrito anteriormente, el presente trabajo pone de manifiesto la importancia de la consideración de los factores dependientes del microorganismo (resistencia antibiótica y virulencia) en la evaluación del pronóstico de los pacientes con bacteriemia por *P. aeruginosa*. En general, muchos de los casos de *P. aeruginosa* MDR/XDR presentados en este trabajo ilustran que la coexistencia de rasgos de virulencia específicos junto con la adquisición de determinantes de resistencia reúne las condiciones necesarias para una “tormenta perfecta” y un pronóstico clínico adverso para el paciente. Estudios como el aquí presentado son necesarios para conocer la situación actual y la proyección de la epidemiología clínica y molecular de la bacteriemia por *P. aeruginosa*, lo cual tiene implicaciones importantes tanto para el establecimiento de medidas de control de la infección como para determinar las perspectivas de las nuevas opciones terapéuticas frente a *P. aeruginosa*, incluyendo las ya disponibles ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam, o los múltiples agentes actualmente en desarrollo.

CONCLUSIONES

- Las características de los episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa* son similares a las descritas previamente en otros estudios. Los factores de riesgo más frecuentemente representados fueron el sexo masculino, el contacto previo con el sistema sanitario, el uso de dispositivos o antibioterapia y la inmunodepresión, todos ellos presentes en más de la mitad de los casos.
- La inmensa mayoría de los episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa* fueron de adquisición nosocomial o asociada al contacto sanitario. Los focos de origen más frecuentes fueron el urinario, el respiratorio y el abdominal. Una gran parte de los pacientes sufrió un importante deterioro de su situación clínica tras el episodio de bacteriemia, presentando hasta un tercio de los casos shock séptico en las primeras 48 horas.
- La presencia de cepas MDR/XDR de *P. aeruginosa* causantes de bacteriemia fue muy elevada (38.3%), siendo únicamente sensibles a colistina, amikacina y/o ceftazidima-avibactam. Los factores asociados a una mayor probabilidad de aislamientos MDR/XDR de *P. aeruginosa* fueron el antecedente de colonización por una cepa MDR/XDR, las neoplasias hematológicas y la neutropenia, y la utilización previa de catéteres vasculares y antibióticos, especialmente los carbapenémicos y las fluoroquinolonas.
- Se objetivó la diseminación endémica de dos clones internacionales de alto riesgo: el clon ST175 (serotipo O4, genotipo *exoU*/*exoS*⁺), asociado a la producción de una carbapenemasa tipo MBL (VIM-2) y el clon ST235 (serotipo O11, genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻), asociado a la producción de una carbapenemasa de clase A (GES-5). Estos clones fueron responsables de la mayoría de los aislamientos de *P. aeruginosa* con fenotipo MDR/XDR, lo que pone en evidencia su importancia clínica y epidemiológica.
- Los episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa* MDR/XDR se asociaron a un peor pronóstico, con una elevada mortalidad global tanto precoz (34.4%) como tardía (52.7%). Este efecto deletéreo fue más llamativo entre las cepas MDR/XDR pertenecientes al clon de alto riesgo ST235, las portadoras del genotipo *exoU*⁺ y aquellas con serotipo O11. Esto demuestra la asociación entre la multirresistencia y la virulencia de *P. aeruginosa*.
- La bacteriemia por *P. aeruginosa* se asoció a una elevada mortalidad global tanto precoz (20.2%) como tardía (33.3%), siendo especialmente elevada en las primeras 48 horas tras el inicio del episodio de bacteriemia.

- Los principales factores pronósticos asociados independientemente a mortalidad precoz y tardía fueron la presencia de neutropenia severa, el foco respiratorio de la bacteriemia, la presentación en forma de shock séptico, la antibioterapia empírica inadecuada, el genotipo *exoU⁺*, el serotipo O11 y un TP corto del hemocultivo. El fenotipo MDR también mostró ser un factor independiente de mortalidad tardía.
- El TP del hemocultivo y la determinación rápida del serotipo O de un aislamiento de *P. aeruginosa*, podrían ser herramientas sencillas capaces de anticipar el pronóstico y el fenotipo de resistencia, incluyendo los clones de alto riesgo, en un paciente con bacteriemia.
- La acumulación de determinantes de resistencia no siempre se asocia a un coste biológico clínico y experimental significativo, como ilustran nuestros casos de bacteriemia causada por cepas MDR/XDR del clon de alto riesgo ST235.
- La virulencia de *P. aeruginosa* puede variar entre cepas con un fenotipo de resistencia similar. Así, la mayoría de las cepas MDR/XDR asociadas al clon de alto riesgo ST235 presentaron el genotipo de virulencia *exoU⁺* y el serotipo O11, mostrando una mayor citotoxicidad *in vitro* y produciendo una mayor letalidad en el modelo de *C. elegans*, en comparación con las cepas MDR/XDR del clon de alto riesgo ST175, caracterizadas por una baja virulencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. D'Agata E. *Pseudomonas aeruginosa* and Other *Pseudomonas* Species. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8th Edition. Elsevier. 2014: 2518–2531.
2. Hoboth C, Hoffmann R, Eichner A, Henke C, Schmoldt S, Imhof A, *et al.* Dynamics of Adaptive Microevolution of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during Chronic Pulmonary Infection in Patients with Cystic Fibrosis . J Infect Dis. 2009; 200(1):118–30.
3. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clinical Microbiology Reviews. 2009; 22(4):582–610.
4. Segata N, Haake S, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, *et al.* Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. Genome Biol. 2012; 13(6):R42.
5. Pitt TL, Simpson AJH. *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. In: Principles and Practice of Clinical Bacteriology. 2nd Edition. John Wiley and Sons Ltd. 2006: 427–33.
6. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 2000; 406(6799):959–64.
7. Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC, Levy SB, Jackson RW. *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. FEMS Microbiol Rev. 2011; 35(4):652–80.
8. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev. 2010; 74(4):621–41.
9. Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. Front Microbiol. 2011; 2:150.
10. Harrison EM, Carter MEK, Luck S, Ou HY, He X, Deng Z, *et al.* Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. Infect Immun. 2010; 78(4):1437–46.
11. Hauser AR. The Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by Injection. Nat Rev Microbiol. 2009;7(9):654–65.
12. Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GPF, Filloux A, Voulhoux R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. International Journal of

- Medical Microbiology. 2010; 300(8):534–43.
13. Sawa T. The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa*: From bacterial pathogenesis to host response. Journal of Intensive Care. 2014; 2(1):10.
 14. Golovkine G, Reboud E, Huber P. Corrigendum: *Pseudomonas aeruginosa* Takes a Multi-Target Approach to Achieve Junction Breach. Front Cell Infect Microbiol. 2018; 8:52.
 15. Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. Pathog Dis. 2013; 67(3):159–73.
 16. Patankar YR, Lovewell RR, Poynter ME, Jyot J, Kazmierczak BI, Berwin B. Flagellar motility is a key determinant of the magnitude of the inflammasome response to *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. 2013; 81(6):2043–52.
 17. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev. 2011; 24(1):29–70.
 18. Howell HA, Logan LK, Hauser AR. Type III secretion of ExoU is critical during early *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. MBio. 2013; 4(2):e00032–13.
 19. El-Solh AA, Hattemer A, Hauser AR, Alhajhusain A, Vora H. Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. Crit Care Med. 2012; 40(4):1157–63.
 20. Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, *et al.* Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. Clin Infect Dis. 2015; 60(4):539–48.
 21. Hattemer A, Hauser A, Diaz M, Scheetz M, Shah N, Allen JP, *et al.* Bacterial and clinical characteristics of health care-and community-acquired bloodstream infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57(8):3969–75.
 22. Recio R, Villa J, Viedma E, Orellana M, Lora-Tamayo J, Chaves F. Bacteraemia due to extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 high-risk clone: Facing the perfect storm. Int J Antimicrob Agents. 2018; 52(2):172–79.
 23. Recio R, Mancheño M, Viedma E, Villa J, Orellana M a. A, Lora-Tamayo J, *et al.* Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and impact of antimicrobial resistance and bacterial virulence. Antimicrob Agents Chemother. 2020; 64(2):e01759–19.

24. Recio R, Sánchez-Diener I, Viedma E, Meléndez-Carmona MÁ, Villa J, Orellana MÁ, *et al.* Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia isolates in a high-endemicity setting for ST175 and ST235 high-risk clones. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020; 39(4):671–678.
25. Naito Y, Moriyama K, Sawa T. Anti-PcrV Immunization for *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in Cystic Fibrosis. In: *Progress in Understanding Cystic Fibrosis.* 2017: 159–173.
26. Feltman H, Jain M, Peterson L, Schulert G, Khan S, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 2001; 147(10):2659–69.
27. Dortet L, Lombardi C, Cretin F, Dessen A, Filloux A. Pore-forming activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system translocon alters the host epigenome. *Nat Microbiol.* 2018; 3(3):378–386.
28. Pastrana D V., Hanson AJ, Knisely J, Bu G, FitzGerald DJ. LRP1B functions as a receptor for *Pseudomonas* exotoxin. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2005; 1741(3):234–9.
29. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68(4):692–744.
30. Kida Y, Higashimoto Y, Inoue H, Shimizu T, Kuwano K. A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-KB through protease-activated receptors. *Cell Microbiol.* 2008; 10(7):1491–504.
31. Hachani A, Lossi NS, Hamilton A, Jones C, Bleves S, Albasa-Jové D, *et al.* Type VI secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*: Secretion and multimerization of VgrG proteins. *J Biol Chem.* 2011; 286(14):12317–27.
32. Jayaseelan S, Ramaswamy D, Dharmaraj S. Pyocyanin: Production, applications, challenges and new insights. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2014; 30(4):1159–68.
33. Deptuła A, Gospodarek E. Reduced expression of virulence factors in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Arch Microbiol.* 2010; 192(1):79–84.
34. Soberón-Chávez G, Lépine F, Déziel E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2005; 68(6):718–25.

35. Elsen S, Huber P, Bouillot S, Couté Y, Fournier P, Dubois Y, *et al.* A type III secretion negative clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* employs a two-partner secreted exolysin to induce hemorrhagic pneumonia. *Cell Host Microbe*. 2014; 15(2):164–76.
36. Basso P, Ragno M, Elsen S, Reboud E, Golovkine G, Bouillot S, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* pore-forming exolysin and type IV pili cooperate to induce host cell lysis. *MBio*. 2017; 8(1):e02250–16.
37. Cornelis P, Dingemans J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2013; 3:75.
38. Maldonado RF, Sá-Correia I, Valvano MA. Lipopolysaccharide modification in gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiology Reviews*. 2016; 40(4):480–93.
39. Jamasbi RJ, Proudfoot EM. Phenotypic and Genotypic Characteristics of Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: Rate of Occurrence and Distribution of Different Serotypes, Antimicrobial Susceptibility Profiles, and Molecular Typing. *Lab Med*. 2008; 25(1):65–71.
40. del Barrio-Tofiño E, Sánchez-Diener I, Zamorano L, Cortes-Lara S, López-Causapé C, Cabot G, *et al.* Association between *Pseudomonas aeruginosa* O-antigen serotypes, resistance profiles and high-risk clones: results from a Spanish nationwide survey. *J Antimicrob Chemother*. 2019; 74(11):3217–20.
41. Lu Q, Eggimann P, Luyt C-E, Wolff M, Tamm M, François B, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. *Crit Care*. 2014; 18(1):R17.
42. Le Berre R, Nguyen S, Nowak E, Kipnis E, Pierre M, Quenee L, *et al.* Relative contribution of three main virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Crit Care Med*. 2011; 39(9):2113–20.
43. Baker NR, Minor V, Deal C, Shahrabadi MS, Simpson DA, Woods DE. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is an adhesin. *Infect Immun*. 1991; 59(9):2859–63.
44. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*. 2014; 6(1):26–41.
45. De Kievit TR. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*. 2009; 11(2):279–88.

46. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005; 171(11):1209–23.
47. Valderrey AD, Pozuelo MJ, Jiménez PA, Maciá MD, Oliver A, Rotger R. Chronic colonization by *Pseudomonas aeruginosa* of patients with obstructive lung diseases: Cystic fibrosis, bronchiectasis, and chronic obstructive pulmonary disease. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010; 68(1):20–7.
48. Maciá MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Pérez JL, Oliver A. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(8):3382–6.
49. Häußler S, Ziegler I, Löttel A, Götz F V., Rohde M, Wehmhöner D, *et al*. Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J Med Microbiol*. 2003; 52(4):295–301.
50. Dacheux D, Toussaint B, Richard M, Brochier G, Croize J, Attree I. *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun*. 2000; 68(5):2916–24.
51. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7:39.
52. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, *et al*. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Microbiol Rev*. 2019; 32(4):e00031–19.
53. Livermore DM. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002; 34(5):634–40.
54. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*. 2006; 43 (Supl 2):S49–56.
55. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates*. 2015; 21-22:41–59.
56. Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*. 2011; 19(8):419–26.

57. Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: Role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(8):2263–8.
58. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the max. *Front Microbiol*. 2011; 2:65.
59. Fisher JF, Mobashery S. The sentinel role of peptidoglycan recycling in the β -lactam resistance of the Gram-negative *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic Chemistry*. 2014; 56:41–8.
60. Juan C, Moyá B, Pérez JL, Oliver A. Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level β -lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(5):1780–7.
61. Mulet X, Moyá B, Juan C, Macià MD, Pérez JL, Blázquez J, *et al*. Antagonistic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance mechanisms in planktonic but not biofilm growth. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(10):4560–8.
62. Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. In: *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2001; 3(2):255–64.
63. Hancock REW, Brinkman FSL. Function of *Pseudomonas* Porins in Uptake and Efflux . *Annu Rev Microbiol*. 2002; 56:17–38.
64. Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, *et al*. *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection*. 2007; 13(6):560–78.
65. Ambler RP, Coulson AFW, Frère JM, Ghuyssen JM, Joris B, Forsman M, *et al*. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases . *Biochem J*. 1991; 276(1):269–70.
66. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010; 54(3):969–76.
67. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38(1):104–14.
68. Akinci E, Vahaboglu H. Minor extended-spectrum β -lactamases. *Expert Review of Anti-*

- Infective Therapy. 2010; 8(11):1251–8.
69. Bebrone C, Bogaerts P, Delbrück H, Bennink S, Kupper MB, De Castro RR, *et al.* GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-type β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(1):396–401.
 70. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended- spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(3):622–32.
 71. Fraile-Ribot PA, Mulet X, Cabot G, Del Barrio-Tofiño E, Juan C, Pérez JL, *et al.* *In vivo* emergence of resistance to novel cephalosporin– β -lactamase inhibitor combinations through the duplication of amino acid D149 from OXA-2 β -lactamase (OXA-539) in sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(9):e01117–17.
 72. Hall LMC, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(8):1637–44.
 73. Viedma E, Juan C, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F, *et al.* Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum β -lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(11):4930–3.
 74. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(4):1151–61.
 75. Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, Palepou MFI, Goering R V., Hanson ND. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(2):557–62.
 76. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(4):1553–5.
 77. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, *et al.* Molecular characterization of an enterobacterial metallo β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother.*

- 1994; 38(1):71–8.
78. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, *et al.* Cloning and characterization of bla(VIM), a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(7):1584–90.
 79. Viedma E, Juan C, Villa J, Barrado L, Ángeles Orellana M, Sanz F, *et al.* VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(8):1235–41.
 80. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SGB, Miles RS, Amyes SGB. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 1993; Feb; 2(2):81–7.
 81. Sevillano E, Gallego L, García-Lobo JM. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P.aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol.* 2009; 57(6):493–5.
 82. El Garch F, Bogaerts P, Bebrone C, Galleni M, Glupczynski Y. OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(10):4828–33.
 83. Sociedad Española de Medicina Preventiva SP e H. Estudio Epine-Epps 2017. *Estud EPiNE.* 2017.
 84. Oliver A, Alarcón T, Caballero E, Cantón R. Microbiological diagnosis of bronchopulmonary colonization-infection in cystic fibrosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009; 27(2):89–104.
 85. Hatchette TF, Gupta R, Marrie TJ. *Pseudomonas aeruginosa* Community-Acquired Pneumonia in Previously Healthy Adults: Case Report and Review of the Literature . *Clin Infect Dis.* 2000; 31(6):1349–56.
 86. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(1):43–8.
 87. Palomar M, Nuvials X, Álvarez Lerma F, Olaechea P, López Pueyo MJ, Gimeno Costa R, *et al.* Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en servicios de medicina intensiva. *Envin-Helics.* 2012.

88. Koh AY, Priebe GP, Ray C, Van Rooijen N, Pier GB. Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect Immun*. 2009; 77(12):5300–10.
89. Tofas P, Samarkos M, Piperaki ET, Kosmidis C, Triantafyllopoulou ID, Kotsopoulou M, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in patients with hematologic malignancies: risk factors, treatment and outcome. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017; 88(4):335–341.
90. Parkins MD, Gregson DB, Pitout JDD, Ross T, Laupland KB. Population-based study of the epidemiology and the risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *Infection*. 2010; 38(1):25–32.
91. Al-Hasan MN, Wilson JW, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Baddour LM. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia: A Population-Based Study. *Am J Med*. 2008; 121(8):702–8.
92. Pfaller MA, Jones RN, Beach M. Survey of Bloodstream Infections Due to Gram-Negative Bacilli: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. *Clin Infect Dis*. 1999; 29(3):595–607.
93. Decousser JW, Pina P, Picot F, Delalande C, Pangon B, Courvalin P, *et al.* Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infections: A French prospective national survey. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 51(5):1213–22.
94. Siegman-Igra Y, Fourer B, Orni-Wasserlauf R, Golan Y, Noy A, Schwartz D, *et al.* Reappraisal of Community-Acquired Bacteremia: A Proposal of a New Classification for the Spectrum of Acquisition of Bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2002; 34(11):1431–9.
95. Rodríguez-Baño J, López-Prieto MD, Portillo MM, Retamar P, Natera C, Nuño E, *et al.* Epidemiology and clinical features of community-acquired, healthcare-associated and nosocomial bloodstream infections in tertiary-care and community hospitals. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16(9):1408–13.
96. Hernandez C, Cobos-Trigueros N, Feher C, Morata L, De La Calle C, Marco F, *et al.* Community-onset bacteraemia of unknown origin: clinical characteristics, epidemiology and outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33(11):1973–80.
97. Cheong HS, Kang CI, Wi YM, Ko KS, Chung DR, Lee NY, *et al.* Inappropriate initial

- antimicrobial therapy as a risk factor for mortality in patients with community-onset *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008; 27(12):1219–25.
98. Rojas A, Palacios-Baena ZR, López-Cortés LE, Rodríguez-Baño J. Rates, predictors and mortality of community-onset bloodstream infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: systematic review and meta-analysis. Clinical Microbiology and Infection. 2019; 25(8):964–970.
 99. Iversen BG, Brantsæter AB, Aavitsland P. Nationwide study of invasive *Pseudomonas aeruginosa* infection in Norway: Importance of underlying disease. J Infect. 2008; 57(2):139–46.
 100. Zarb P, Coignard B, Griskeviciene J, Muller A, Vankerckhoven V, Weist K, *et al.* European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance report - Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Eurosurveillance. 2012.
 101. Schechner V, Nobre V, Kaye KS, Leshno M, Giladi M, Rohner P, *et al.* Gram-Negative Bacteremia upon Hospital Admission: When Should *Pseudomonas aeruginosa* Be Suspected? . Clin Infect Dis. 2009; 48(5):580–6.
 102. Thuong M, Arvaniti K, Ruimy R, de la Salmonière P, Scanvic-Hameg A, Lucet JC, *et al.* Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. J Hosp Infect. 2003; 53(4):274–82.
 103. Vuotto F, Berthon C, Lemaitre N, Duhamel A, Balkaran S, Le Ray E, *et al.* Risk factors, clinical features, and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with hematologic malignancies: A case-control study. Am J Infect Control. 2013; 41(6):527–30.
 104. Gransden WR, Leibovici L, Eykyn SJ, Pitlik SD, Samra Z, Konisberger H, *et al.* Risk factors and a clinical index for diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. Clin Microbiol Infect. 1995; 1(2):119–123.
 105. Gómez-Zorrilla S, Camoez M, Tubau F, Periche E, Cañizares R, Dominguez MA, *et al.* Antibiotic pressure is a major risk factor for rectal colonization by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58(10):5863–70.

106. Thaden JT, Park LP, Maskarinec SA, Ruffin F, Fowler VG, van Duin D. Results from a 13-Year Prospective Cohort Study Show Increased Mortality Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Compared to Other Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6):1–11.
107. Chatzinikolaou I, Abi-Said D, Bodey GP, Rolston KVI, Tarrand JJ, Samonis G. Recent experience with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with cancer: Retrospective analysis of 245 episodes. *Arch Intern Med.* 2000; 160(4):501–9.
108. Marin M, Gudiol C, Ardanuy C, Garcia-Vidal C, Calvo M, Arnan M, *et al.* Bloodstream infections in neutropenic patients with cancer: Differences between patients with haematological malignancies and solid tumours. *J Infect.* 2014; 69(5):417–23.
109. López-Pueyo MJ, Olaechea-Astigarraga P, Palomar-Martínez M, Insausti-Ordeñana J, Álvarez-Lerma F. Quality control of the surveillance programme of ICU-acquired infection (ENVIN-HELICS registry) in Spain. *J Hosp Infect.* 2013; 84(2):126–31.
110. Marra AR, Bar K, Bearman GML, Wenzel RP, Edmond MB. Systemic inflammatory response syndrome in adult patients with nosocomial bloodstream infection due to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect.* 2006; 53(1):30–5.
111. Lavoie EG, Wangdi T, Kazmierczak BI. Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes and Infection.* 2011; 13(14-15):1133–45.
112. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - Journal of the American Medical Association.* 2016; 315(8):801–10.
113. Bosmann M, Ward PA. The inflammatory response in sepsis. *Trends in Immunology.* 2013; 34(3):129–36.
114. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: A novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *The Lancet Infectious Diseases.* 2013; 13(3):260–8.
115. Mensa J, Barberán J, Soriano A, Llinares P, Marco F, Cantón R, *et al.* Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines by the Spanish society of chemotherapy. *Rev Esp Quimioter.* 2018; 31(1):78–100.
116. Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in Context.* 2018; 7:212527.

117. McKinnon PS, Paladino JA, Schentag JJ. Evaluation of area under the inhibitory curve (AUC) and time above the minimum inhibitory concentration (T>MIC) as predictors of outcome for cefepime and ceftazidime in serious bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31(4):345–51.
118. Nicasio AM, Ariano RE, Zelenitsky SA, Kim A, Crandon JL, Kuti JL, *et al*. Population pharmacokinetics of high-dose, prolonged-infusion cefepime in adult critically ill patients with ventilator-associated pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(4):1476–81.
119. Dulhunty JM, Roberts JA, Davis JS, Webb SAR, Bellomo R, Gomersall C, *et al*. Continuous infusion of beta-lactam antibiotics in severe sepsis: A multicenter double-blind, randomized controlled trial. *Clin Infect Dis*. 2013; 56(2):236–44.
120. Rafati MR, Rouini MR, Mojtahedzadeh M, Najafi A, Tavakoli H, Gholami K, *et al*. Clinical efficacy of continuous infusion of piperacillin compared with intermittent dosing in septic critically ill patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2006; 28(2):122–7.
121. Chytra I, Stepan M, Benes J, Pelnar P, Zidkova A, Bergerova T, *et al*. Clinical and microbiological efficacy of continuous versus intermittent application of meropenem in critically ill patients: A randomized open-label controlled trial. *Crit Care*. 2012;16(3):R113.
122. Tam VH, Schilling AN, Melnick DA, Coyle EA. Comparison of β -lactams in counter-selecting resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005; 52(2):145–51.
123. Mouton JW. Combination therapy as a tool to prevent emergence of bacterial resistance. In: *Infection*. 1999; 27 (Suppl 2):S24–8.
124. Kang C-I, Kim S-H, Kim H-B, Park S-W, Choe Y-J, Oh M-D, *et al*. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin Infect Dis*. 2003;37(6):745–51.
125. Morata L, Cobos-Trigueros N, Martínez JA, Soriano Á, Almela M, Marco F, *et al*. Influence of multidrug resistance and appropriate empirical therapy on the 30-day mortality rate of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(9):4833–7.
126. Tumbarello M, Repetto E, Trecarichi EM, Bernardini C, De Pascale G, Parisini A, *et al*. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: Risk factors and

- mortality. *Epidemiol Infect.* 2011; 139(11):1740–9.
127. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: Importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(4):1306–11.
 128. Vardakas KZ, Tansarli GS, Bliziotis IA, Falagas ME. β -Lactam plus aminoglycoside or fluoroquinolone combination versus β -lactam monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections: A meta-analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2013; 41(4):301–10.
 129. Vidal F, Mensa J, Almela M, Martínez JA, Marco F, Casals C, *et al.* Epidemiology and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia, with special emphasis on the influence of antibiotic treatment: Analysis of 189 episodes. *Arch Intern Med.* 1996; 156(18):2121–6.
 130. Peña C, Suarez C, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, *et al.* Effect of adequate single-drug vs combination antimicrobial therapy on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: A post hoc analysis of a prospective cohort. *Clin Infect Dis.* 2013; 57(2):208–16.
 131. Bowers DR, Liew YX, Lye DC, Kwa AL, Hsu LY, Tam VH. Outcomes of appropriate empiric combination versus monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(3):1270–4.
 132. Wright H, Bonomo RA, Paterson DL. New agents for the treatment of infections with Gram-negative bacteria: restoring the miracle or false dawn? *Clinical Microbiology and Infection.* 2017; 23(10):704–712.
 133. Zhanel GG, Chung P, Adam H, Zelenitsky S, Denisuik A, Schweizer F, *et al.* Ceftolozane/tazobactam: A novel cephalosporin/ β -lactamase inhibitor combination with activity against multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Drugs.* 2014; 74(1):31–51.
 134. Keepers TR, Gomez M, Celeri C, Nichols WW, Krause KM. Bactericidal activity, absence of serum effect, and time-kill kinetics of ceftazidime-avibactam against β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(9):5297–305.
 135. Torres A, Zhong N, Pachl J, Timsit JF, Kollef M, Chen Z, *et al.* Ceftazidime-avibactam versus meropenem in nosocomial pneumonia, including ventilator-associated pneumonia

- (REPROVE): a randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis.* 2018; 18(3):285–295.
136. Tunkel AR, Hasbun R, Bhimraj A, Byers K, Kaplan SL, Scheld WM, *et al.* 2017 Infectious Diseases Society of America's Clinical Practice Guidelines for Healthcare-Associated Ventriculitis and Meningitis. *Clin Infect Dis.* 2017; 64(6):e34–e65.
 137. Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, *et al.* Clinical features and outcome of patients with community-acquired *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11(5):415–8.
 138. Cheong HS, Kang CI, Wi YM, Kim ES, Lee JS, Ko KS, *et al.* Clinical Significance and Predictors of Community-Onset *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia. *Am J Med.* 2008; 121(8):709–14.
 139. Kang C, Kim S, Park WB, Kim H, Kim E, Oh M, *et al.* Risk Factors for Mortality and Impact of Inappropriate Initial Antimicrobial Therapy on Outcome Bloodstream Infections Caused by Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):760–6.
 140. Osmon S, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. Hospital Mortality for Patients with Bacteremia Due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest.* 2004; 125(2):607–16.
 141. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *Clin Infect Dis.* 2004; 39(3):309–17.
 142. Juan C, Peña C, Oliver A. Host and pathogen biomarkers for severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis.* 2017; 215(Suppl 1):S44–S51.
 143. Geisinger E, Isberg RR. Interplay between antibiotic resistance and virulence during Disease promoted by multidrug-resistant bacteria. *J Infect Dis.* 2017; 215(Suppl 1):S9–S17.
 144. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *J Chronic Dis.* 1987; 40(5):373–83.
 145. Migiyama Y, Yanagihara K, Kaku N, Harada Y, Yamada K, Nagaoka K, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia among immunocompetent and immunocompromised patients: Relation to initial antibiotic therapy and survival. *Jpn J Infect Dis.* 2016; 69(2):91–6.

146. Suárez C, Peña C, Gavalda L, Tubau F, Manzur A, Dominguez MA, *et al.* Influence of carbapenem resistance on mortality and the dynamics of mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *Int J Infect Dis.* 2010; 14 (Suppl 3):e73–8.
147. Schechner V, Gottesman T, Schwartz O, Korem M, Maor Y, Rahav G, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia upon hospital admission: Risk factors for mortality and influence of inadequate empirical antimicrobial therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 71(1):38–45.
148. Kim YJ, Jun YH, Kim YR, Park KG, Park YJ, Kang JY, *et al.* Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia; retrospective study of impact of combination antimicrobial therapy. *BMC Infect Dis.* 2014; 14:161.
149. Chow JW. *Enterobacter* Bacteremia: Clinical Features and Emergence of Antibiotic Resistance during Therapy. *Ann Intern Med.* 1991 Oct 15;115(8):585.
150. Joo E-J, Kang C-I, Ha YE, Kang S-J, Park SY, Chung DR, *et al.* Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: clinical impact of antimicrobial resistance on outcome. *Microb Drug Resist.* 2011; 17(2):305–12.
151. Peña C, Suarez C, Gozalo M, Murillas J, Almirante B, Pomar V, *et al.* Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(3):1265–72.
152. Lee CH, Su TY, Ye J, Hsu PC, Kuo AJ, Chia JH, *et al.* Risk factors and clinical significance of bacteremia caused by *Pseudomonas aeruginosa* resistant only to carbapenems. *J Microbiol Immunol Infect.* 2017; 50(5):677–683.
153. Jeong SJ, Yoon SS, Bae IK, Jeong SH, Kim JM, Lee K. Risk factors for mortality in patients with bloodstream infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact of bacterial virulence and strains on outcome. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014; 80(2):130–5.
154. Dantas RC, Ferreira ML, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: Independent risk factors for mortality and impact of resistance on outcome. *J Med Microbiol.* 2014; 63(12):1679–1687.
155. Tam VH, Rogers CA, Chang KT, Weston JS, Caeiro JP, Garey KW. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia on patient outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(9):3717–22.

156. Hirsch EB, Cottreau JM, Chang KT, Caeiro JP, Johnson ML, Tam VH. A model to predict mortality following *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012; 72(1):97–102.
157. Koprnova J, Beno P, Korcova J, Mrazova M, Grey E, Liskova A, *et al*. Bacteremia due to *Pseudomonas aeruginosa*: Results from a 3-year national study in the Slovak Republic. *J Chemother*. 2005; 17(5):470–6.
158. Tang PC, Lee CC, Li CW, Li MC, Ko WC, Lee NY. Time-to-positivity of blood culture: An independent prognostic factor of monomicrobial *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect*. 2017; 50(4):486–493.
159. Willmann M, Kuebart I, Vogel W, Flesch I, Markert U, Marschal M, *et al*. Time to positivity as prognostic tool in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *J Infect*. 2013; 67(5):416–23.
160. Osih RB, McGregor JC, Rich SE, Moore AC, Furuno JP, Perencevich EN, *et al*. Impact of empiric antibiotic therapy on outcomes in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(3):839–44.
161. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al*. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268–81.
162. Zhanel GG, DeCorby M, Adam H, Mulvey MR, McCracken M, Lagacé-Wiens P, *et al*. Prevalence of antimicrobial-resistant pathogens in Canadian hospitals: Results of the Canadian Ward Surveillance study (CANWARD 2008). *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(11):4684–93.
163. Zilberberg MD, Shorr AF. Prevalence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* among specimens from hospitalized patients with pneumonia and bloodstream infections in the United States from 2000 to 2009. *J Hosp Med*. 2013; 8(10):559–63.
164. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012. *Int J Antimicrob Agents*. 2014; 43(4):328–34.

165. Del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Cabot G, Rivera A, Benito N, Segura C, *et al.* Genomics and susceptibility profiles of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(11):e01589–17.
166. del Barrio-Tofiño E, Zamorano L, Cortes-Lara S, López-Causapé C, Sánchez-Diener I, Cabot G, *et al.* Spanish nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance mechanisms and epidemiology. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 74(7):1825–1835.
167. Giani T, Arena F, Pollini S, Di Pilato V, D’Andrea MM, De Angelis LH, *et al.* Italian nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* from invasive infections: Activity of ceftolozane/tazobactam and comparators, and molecular epidemiology of carbapenemase producers. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73(3):664–671.
168. Evans SR, Hujer AM, Jiang H, Hujer KM, Hall T, Marzan C, *et al.* Rapid Molecular Diagnostics, Antibiotic Treatment Decisions, and Developing Approaches to Inform Empiric Therapy: PRIMERS i and II. *Clin Infect Dis.* 2016; 62(2):181–9.
169. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, *et al.* Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009; 48(1):1–12.
170. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International.* 2016; 2016:2475067.
171. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018; 18(3):318–327.
172. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Kattula D, Burkert F, Tacconelli. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. World Health Organization. 2017.
173. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. ECDC: Surveillance Report. 2018.
174. Peña C, Suarez C, Tubau F, Gutierrez O, Domínguez A, Oliver A, *et al.* Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* producing the metallo- β -lactamase VIM-2 in a Spanish hospital: Clinical and epidemiological implications. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13(10):1026–9.

175. Peña C, Suarez C, Tubau F, Juan C, Moya B, Dominguez MA, *et al.* Nosocomial outbreak of a non-cefepime-susceptible ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain overexpressing MexXY-OprM and producing an integron-borne PSE-1 β -lactamase. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(8):2381–7.
176. Suarez C, Peña C, Arch O, Dominguez MA, Tubau F, Juan C, *et al.* A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: A new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. *BMC Infect Dis.* 2011; 11:272.
177. García-Castillo M, Del Campo R, Morosini MI, Riera E, Cabot G, Willems R, *et al.* Wide dispersion of ST175 clone despite high genetic diversity of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(8):2905–10.
178. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews.* 2011; 35(5):736–55.
179. Treepong P, Kos VN, Guyeux C, Blanc DS, Bertrand X, Valot B, *et al.* Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clin Microbiol Infect.* 2018; 24(3):258–266.
180. Miyoshi-Akiyama T, Tada T, Ohmagari N, Viet Hung N, Tharavichitkul P, Pokhrel BM, *et al.* Emergence and Spread of Epidemic Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Biol Evol.* 2017;9(12):3238–45.
181. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5644–9.
182. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, *et al.* Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(12):6349–57.
183. Cabot G, Zamorano L, Moyà B, Juan C, Navas A, Blázquez J, *et al.* Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance and fitness under low and high mutation rates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(3):1767–78.
184. Alejandro B, María T, Germán B. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or

- deleterious association in the bacterial world? Clin Microbiol Rev. 2013; 26(2):185–230.
185. Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Zamorano L, Juan C, *et al.* Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(11):5527–35.
 186. Gómez-Zorrilla S, Juan C, Cabot G, Camoez M, Tubau F, Oliver A, *et al.* Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: *In vitro* and *in vivo* studies. Int J Antimicrob Agents. 2016;47(5):368–74.
 187. Vardakas KZ, Rafailidis PI, Konstantelias AA, Falagas ME. Predictors of mortality in patients with infections due to multi-drug resistant Gram negative bacteria: The study, the patient, the bug or the drug? Journal of Infection. 2013; 66(5):401–14.
 188. Neidell MJ, Cohen B, Furuya Y, Hill J, Jeon CY, Glied S, *et al.* Costs of healthcare-and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. Clin Infect Dis. 2012; 55(6):807–15.
 189. Cosgrove SE. The Relationship between Antimicrobial Resistance and Patient Outcomes: Mortality, Length of Hospital Stay, and Health Care Costs. Clin Infect Dis. 2006; 42 (Suppl 2):S82–9.
 190. Martínez JL, Baquero F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: Pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. Clinical Microbiology Reviews. 2002; 15(4):647–79.
 191. Andersson DI. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? Current Opinion in Microbiology. 2006; 9(5):461–5.
 192. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance? Nature Reviews Microbiology. 2010; 8(4):260–71.
 193. Olivares J, Álvarez-Ortega C, Martinez JL. Metabolic compensation of fitness costs associated with overexpression of the multidrug efflux pump MexEF-OprN in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58(7):3904–13.
 194. Abdelraouf K, Kabbara S, Ledesma KR, Poole K, Tam VH. Effect of multidrug resistance-conferring mutations on the fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 2011; 66(6):1311–7.
 195. Giamarellos-Bourboulis EJ, Koussoulas V, Panagou C, Adamis T, Baziaka F, Skiadas I, *et al.*

- Experimental sepsis using *Pseudomonas aeruginosa*: The significance of multi-drug resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2004; 24(4):357–61.
196. Sun Z, Jiao X, Peng Q, Jiang F, Huang Y, Zhang J, *et al*. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is associated with decreased fitness. *Cell Physiol Biochem*. 2013; 31(2-3):347–54.
 197. Nielsen KL, Pedersen TM, Udekwi KI, Petersen A, Skov RL, Hansen LH, *et al*. Fitness cost: A bacteriological explanation for the demise of the first international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67(6):1325–32.
 198. Zur Wiesch PS, Engelstädter J, Bonhoeffer S. Compensation of fitness costs and reversibility of antibiotic resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(5):2085–95.
 199. Navas A, Cobas G, Talavera M, Ayala JA, López JA, Martínez JL. Experimental validation of Haldane’s hypothesis on the role of infection as an evolutionary force for Metazoans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(34):13728–31.
 200. Tan MW, Rahme LG, Sternberg JA, Tompkins RG, Ausubel FM. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(5):2408–13.
 201. Tan MW, Shapira M. Genetic and molecular analysis of nematode-microbe interactions. *Cellular Microbiology*. 2011; 13(4):497–507.
 202. Silverman GA, Luke CJ, Bhatia SR, Long OS, Vetica AC, Perlmutter DH, *et al*. Modeling molecular and cellular aspects of human disease using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Pediatric Research*. 2009; 65(1):10–8.
 203. Moy TI, Conery AL, Larkins-Ford J, Wu G, Mazitschek R, Casadei G, *et al*. High-throughput screen for novel antimicrobials using a whole animal infection model. *ACS Chem Biol*. 2009; 4(7):527–33.
 204. O’Reilly LP, Benson JA, Cummings EE, Perlmutter DH, Silverman GA, Pak SC. Worming our way to novel drug discovery with the *Caenorhabditis elegans* proteostasis network, stress response and insulin-signaling pathways. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2014; 9(9):1021–32.
 205. Tan MW, Ausubel FM. *Caenorhabditis elegans*: A model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*. 2000; 3(1):29–

- 34.
206. Aballay A, Ausubel FM. *Caenorhabditis elegans* as a host for the study of host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*. 2002; 5(1):97–101.
207. Sánchez-Diener I, Zamorano L, López-Causapé C, Cabot G, Mulet X, Peña C, *et al.* Interplay among resistance profiles, high-risk clones, and virulence in the *Caenorhabditis elegans* *Pseudomonas aeruginosa* infection model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(12):e01586–17.
208. Sánchez-Diener I, Zamorano L, Peña C, Ocampo-Sosa A, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, *et al.* Weighting the impact of virulence on the outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect*. 2019; 26(3):351–357.
209. Kirienko N V., Kirienko DR, Larkins-Ford J, Wählby C, Ruvkun G, Ausubel FM. *Pseudomonas aeruginosa* disrupts *Caenorhabditis elegans* iron homeostasis, causing a hypoxic response and death. *Cell Host Microbe*. 2013; 13(4):406–16.
210. Kirienko N V., Cezairliyan BO, Ausubel FM, Powell JR. *Pseudomonas aeruginosa* PA14 pathogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Mol Biol*. 2014; 1149:653–69.
211. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry S a, Trivette SL, Briggs JP, *et al.* Health Care - Associated Bloodstream Infections in Adults: A Reason To Change the Accepted Definition of Community - Acquired Infections. *Ann Fam Med*. 2002;791–8.
212. Rhee JY, Kwon KT, Ki HK, Shin SY, Jung DS, Chung DR, *et al.* Scoring systems for prediction of mortality in patients with intensive care unit-acquired sepsis: A comparison of the Pitt bacteremia score and the acute physiology and chronic health evaluation II scoring systems. *Shock*. 2009; 31(2):146–50.
213. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005; 171(4):388–416.
214. Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Process*. 1987; 78: 53–68.
215. EUCAST. European committee on antimicrobial susceptibility testing breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *Eur Comm Antimicrob Susceptibility Testing*. 2018.

216. Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, *et al.* Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(12):4329–35.
217. Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Med.* 1998; 15:33–50.
218. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, Mickelsen P a, Murray BE, Persing DH, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233–2239.
219. Lam JS, Taylor VL, Islam ST, Hao Y, Kocíncová D. Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Front Microbiol.* 2011; 2:118.
220. Hawdon NA, Aval PS, Barnes RJ, Gravelle SK, Rosengren J, Khan S, *et al.* Cellular responses of A549 alveolar epithelial cells to serially collected *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients at different stages of pulmonary infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010; 59(2):207–20.
221. Pérez-Gallego M, Torrens G, Castillo-Vera J, Moya B, Zamorano L, Cabot G, *et al.* Impact of AmpC derepression on fitness and virulence: the mechanism or the pathway? *MBio.* 2016; 7(5):e01783–16.
222. Callejas-Díaz A, Fernández-Pérez C, Ramos-Martínez A, Múñez-Rubio E, Sánchez-Romero I, Vargas Núñez JA. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in a tertiary hospital: Mortality and prognostic factors. *Med Clin (Barc).* 2019; 152(3):83–89.
223. Fujitani S, Sun HY, Yu VL, Weingarten JA. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: Part I: Epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest.* 2011; 139(4):909–919.
224. Wenzler E, Deraedt MF, Harrington AT, Danizger LH. Synergistic activity of ceftazidime-avibactam and aztreonam against serine and metallo- β -lactamase-producing gram-negative pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017; 88(4):352–354.
225. Davido B, Fellous L, Lawrence C, Maxime V, Rottman M, Dinha A. Ceftazidime-avibactam and aztreonam, an interesting strategy to overcome β -Lactam resistance conferred by Metallo- β -Lactamases in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2017; 61(9):e01008–17.
226. Gómez-Zorrilla S, Camoez M, Tubau F, Cañizares R, Periche E, Dominguez MA, *et al.* Prospective observational study of prior rectal colonization status as a predictor for

- subsequent development of *Pseudomonas aeruginosa* clinical infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59(9):5213–9.
227. Shoai Tehrani M, Hajage D, Fihman V, Tankovic J, Cau S, Day N, *et al*. Gram-negative bacteremia: Which empirical antibiotic therapy? *Med Mal Infect*. 2014; 44(4):159–66.
 228. Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim H Bin, Kim EC, *et al*. Risk factors for antimicrobial resistance and influence of resistance on mortality in patients with bloodstream infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist*. 2005; 11(1):68–74.
 229. Montero M, Sala M, Riu M, Belvis F, Salvado M, Grau S, *et al*. Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. Impact of antibiotic use in a double case-control study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010; 29(3):335–9.
 230. López-Dupla M, Martínez JA, Vidal F, Almela M, Soriano A, Marco F, *et al*. Previous ciprofloxacin exposure is associated with resistance to β -lactam antibiotics in subsequent *Pseudomonas aeruginosa* bacteremic isolates. *Am J Infect Control*. 2009; 37(9):753–8.
 231. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, *et al*. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS One*. 2009; 13; 4(11):e7740.
 232. Sullivan E, Bensman J, Lou M, Agnello M, Shriner K, Wong-Beringer A. Risk of developing pneumonia is enhanced by the combined traits of fluoroquinolone resistance and type III secretion virulence in respiratory isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med*. 2014;42(1):48–56.
 233. Faure K, Shimabukuro D, Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, Wiener-Kronish JP. O-antigen serotypes and type III secretory toxins in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(5):2158–60.
 234. Berthelot P, Attree I, Plésiat P, Chabert J, de Bentzmann S, Pozzetto B, *et al*. Genotypic and Phenotypic Analysis of Type III Secretion System in a Cohort of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia Isolates: Evidence for a Possible Association between O Serotypes and exo Genes. *J Infect Dis*. 2003; 188 (4):512–8.

ANEXOS

Anexo 1. Publicaciones en revistas científicas indexadas

International Journal of Antimicrobial Agents 52 (2018) 172–179



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicagBacteraemia due to extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 high-risk clone: Facing the perfect stormRaúl Recio^{a,*}, Jennifer Villa^a, Esther Viedma^a, María Ángeles Orellana^a, Jaime Lora-Tamayo^b, Fernando Chaves^a^a Department of Clinical Microbiology, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12), Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain^b Department of Internal Medicine, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12), Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 January 2018
Accepted 27 March 2018

Keywords:
Pseudomonas aeruginosa
Multidrug-resistant
High-risk clones
Virulence
Bacteraemia
Mortality

ABSTRACT

Predictors of mortality and the impact of multidrug resistance and virulence on patients with *Pseudomonas aeruginosa* (PA) bacteraemia were evaluated. Patients with PA bacteraemia in a 12-month period were retrospectively analysed. Carbapenemase production, molecular typing and identification of virulence factor ExoU were carried out. The activity of ceftolozane-tazobactam and ceftazidime-avibactam was also investigated. The primary endpoint was 30-day crude mortality. Of 64 patients with bacteraemia, 24 (37.5%) were caused by extensively drug-resistant PA (XDR-PA); 10 (41.7%) cases involved the VIM-2 carbapenemase-producing ST175 clone, 11 (45.8%) the GES-5 carbapenemase-producing ST235 clone, and 3 (12.5%) were non-carbapenemase producers. The *exoU* genotype was detected in all ST235 strains and in 6 (15%) of the non-XDR isolates. Ceftazidime-avibactam (58.3%) showed greater activity than ceftolozane-tazobactam (12.5%) against XDR-PA isolates, particularly in GES-5 producers (100%). The 30-day crude mortality rate in patients with XDR-PA bacteraemia was higher than in cases caused by susceptible strains (62.5% vs. 30%; $P=0.02$). Multivariate analysis showed that independent risk factors associated with 30-day crude mortality were Pitt score ≥ 2 (OR, 42.31; 95% CI, 4.88–366.7; $P=0.001$) and respiratory source of bacteraemia (OR, 49.13; 95% CI 3.89–620.5; $P=0.003$). Stratified analysis adjusting for respiratory source revealed a non-significant trend towards higher mortality in patients with bacteraemia caused by the ST235 clone and *exoU*-producing isolates. These data support the notion that the XDR phenotype associated with the GES-5 carbapenemase-producing ST235 clone and the *exoU*-positive genotype adversely affects the outcome of patients with PA bacteraemia, particularly those with respiratory tract infections and a severe clinical presentation.

© 2018 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a cause of serious Gram-negative bacteraemia associated with high mortality [1]. The emergence of multidrug-resistant *P. aeruginosa* (MDR-PA) and extensively drug-resistant *P. aeruginosa* (XDR-PA) is a major clinical concern [2]. The underlying mechanisms of the MDR/XDR phenotype are heterogeneous and can be mediated by the selection of mutations in the chromosomal genes or by horizontal acquisition of resistance determinants, particularly carbapenemase genes. These resistance elements are strongly linked to the high-risk clones, sequence type (ST) 175, ST235 and ST111, disseminated worldwide. ST235 clone has the widest distribution and is found in all continents. ST111

clone has also been detected in all continents except Oceania, and ST175 clone is widely distributed in most European countries and Japan, but it is rare in other locations [2–4].

Several studies have shown that MDR/XDR profiles in patients with *P. aeruginosa* bacteraemia result in higher mortality [5–8]. However, the real impact of antibiotic resistance on the severity and prognosis of *P. aeruginosa* infections is not well established. Acquisition of antimicrobial resistance frequently incurs a fitness cost, thus reducing virulence and disease severity [9]. Nevertheless, some MDR/XDR-PA strains have been associated with certain virulence factors, including the type III secretion system protein, ExoU, which is one of the major virulence determinants of *P. aeruginosa* and is associated with a highly cytotoxic phenotype [10,11].

The MDR/XDR phenotype significantly limits therapeutic options, potentially obscuring the outcome of episodes of *P. aeruginosa* bacteraemia. New cephalosporin- β -lactamase inhibitor

* Corresponding author: D. Raúl Recio, Department of Clinical Microbiology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avenida de Córdoba, S/N, 28041, Madrid, Spain.

E-mail address: raulrecio@salud.madrid.org (R. Recio).

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.018>

0924-6579/© 2018 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

combinations, ceftolozane-tazobactam and ceftazidime-avibactam, have shown promising activity against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, but it is uncertain whether they remain active against MDR/XDR-PA, because the mechanisms involved in drug resistance are multifactorial [12,13].

Identifying risk factors for mortality is essential for improving patient outcomes. The complex interplay of antimicrobial resistance, virulence and host response to infection should be taken into account to understand the prognosis of *P. aeruginosa* bacteraemia [14–17]. The aim of the present pilot study was to evaluate predictors of mortality in patients with *P. aeruginosa* bacteraemia and to determine whether the resistance profile and virulence genotype influence clinical outcomes.

2. Materials and Methods

2.1. Study design, site and patients

A retrospective cohort study of consecutive adult patients (≥ 18 years old) with *P. aeruginosa* bacteraemia was carried out between January 1st and December 31st 2016 at the Hospital Universitario 12 de Octubre, a tertiary hospital in Madrid, Spain. Only the first episode of bacteraemia was included, and patients with polymicrobial bacteraemia were excluded. Patient data were collected via chart review and included the following: demographics and baseline characteristics, clinical data at the time of bacteraemia, antibiotic therapy, and outcome. The study was approved by the Research Ethics Committee of our centre (TP17/0041).

2.2. Variables and definitions

Nosocomial bacteraemia was defined as infection occurring more than 48 h after hospital admission. Healthcare-associated bacteraemia was defined according to criteria described previously by Friedman et al. [18]. Source of bacteraemia was divided into 2 categories: high-risk sources, which included the respiratory tract, intra-abdominal, soft tissue and those of unknown origin; and low-risk sources, which included all other sources [19]. Phenotypic classification of *P. aeruginosa* isolates was in accordance with recent standard definitions [20]. MDR-PA isolates were defined as strains non-susceptible to at least 1 agent in 3 or more antipseudomonal antimicrobial categories. XDR-PA strains were defined as non-susceptible to at least 1 agent in all but 2 or fewer antipseudomonal antimicrobial categories; thus, an XDR-PA isolate was also included as MDR-PA. All other *P. aeruginosa* isolates, including those non-susceptible to ≥ 1 agent in <3 antimicrobial categories (moderately resistant), and those susceptible to all antimicrobial agents (susceptible), were considered to be non-MDR-PA strains. Septic shock was defined as sepsis associated with evidence of organ hypoperfusion and systolic blood pressure <90 mmHg or the need for vasopressors to maintain blood pressure [21]. Severity of acute illness at onset of bacteraemia was measured using the Pitt bacteraemia score [22]. Neutropenia was defined as an absolute neutrophil count of <500 neutrophils/ μ L. Immunosuppressive therapy was considered when chemotherapy, radiotherapy or immunosuppressive agents were administered in the 30-day period preceding the bacteraemia episode. Appropriate empirical antibiotic therapy was considered when at least 1 antipseudomonal antibiotic with in vitro activity was administered during the first 24 h after taking the blood sample. Appropriate targeted antibiotic therapy was defined as the administration of at least 1 antibiotic with in vitro activity against the isolate once antimicrobial susceptibility analyses were available. Additional therapy was defined as procedures required for bacteraemia source control (removal of intravenous catheters; drainage of purulent collections). Delay in

appropriate therapy was defined as the time from bacteraemia until administration of appropriate therapy.

2.3. Outcome parameters

The primary endpoint was crude mortality at 30 days (i.e. deaths due to all causes). Secondary endpoints were crude mortality at 48 h, and mortality attributable to the episode of bacteraemia. This was considered on clinical grounds, when death happened due to the episode of sepsis/bacteraemia, or because of organ failure developed during the infection (i.e. death by respiratory insufficiency as a consequence of pneumonia). Patients who were discarded for active antimicrobial therapy due to end-stage disease (palliative treatment) were considered not evaluable for the analysis of crude mortality at 30 days, but death was considered to be attributable to bacteraemia.

2.4. Microbiological and molecular studies

Blood cultures were processed using the Bact/Alert 3D[®] blood culture system (Biomérieux, Durham, NC). Identification was carried out using the MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics Inc., Bremen, Germany). Antimicrobial susceptibility testing was performed using a semi-automated microdilution system (Soria Melguizo, Madrid, Spain), including the following antimicrobial agents: ceftazidime, cefepime, aztreonam, piperacillin-tazobactam, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramycin, amikacin, ciprofloxacin and colistin. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of carbapenems, ceftolozane-tazobactam and ceftazidime-avibactam were evaluated by MIC test strips (Liofilchem[®], Italy). Breakpoints were in accordance with the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines, version 7.0 [23]. Carbapenemase production (*bla*_{GES-1}, *bla*_{GES-5}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{IMP-1} and *bla*_{IMP-2}) was assessed by polymerase chain reaction (PCR) followed by sequencing. Detection of the *exoU* gene was evaluated by PCR assay following previously described protocols [24]. Clonal relatedness of XDR-PA strains was studied by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST). PFGE of macrorestriction fragments of chromosomal DNA with *Spe*I digestion and separation of restriction fragments was performed with a CHEF-DR III PFGE system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). PFGE types were defined based on DNA banding patterns using the criteria of Tenover et al. [25]. MLST was carried out in accordance with published protocols on a selection of representative isolates to identify prevalent high-risk clones [26]. Standard DNA amplification and sequencing of seven housekeeping genes (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* and *trpE*) were performed. Isolates were assigned an ST using the allelic profiles available on the MLST database (<http://pubmlst.org/paeruginosa>).

2.5. Statistical analysis

Continuous and categorical variables were compared using the Student's *t*-test or the Mann-Whitney *U* test, and the χ^2 test or Fisher's exact test, respectively. Independent risk factors of mortality were identified using a logistic regression model, including variables with $P \leq 0.1$ in the univariate analysis. Given the high number of potential predictors of mortality, a backward stepwise algorithm was used to identify the best-fitting subset of variables for use in the final multivariate regression model. The likelihood ratio criteria were used for choosing the best model. Absence of co-linearity among variables included in the initial model was verified. Kaplan-Meier survival curves were used for survival analysis, and the log-rank test was used to compare differences between groups. All statistical tests were two-tailed and a *P*-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant. Analyses were

Table 1
Baseline characteristics and clinical features of all episodes of *P. aeruginosa* bacteraemia.

Characteristic	Total (n=64)	Non-XDR-PA (n=40)	XDR-PA (n=24)	P-value
Age (years) [median (IQR)]	67 (22–92)	59 (41–87)	64 (22–92)	0.21
Male sex	43 (67.2)	28 (70)	15 (62.5)	0.59
Acquisition type				
Community	10 (15.6)	10 (25)	0	0.01
Healthcare-associated	21 (32.8)	14 (35)	7 (29.2)	0.78
Nosocomial	33 (51.6)	16 (40)	17 (70.8)	0.02
Recent ICU admission (3 months)	10 (15.6)	5 (12.5)	5 (20.8)	0.48
Vascular catheter ^a	42 (65.6)	24 (60)	18 (75)	0.28
Urinary catheter ^a	27 (42.2)	14 (35)	13 (54.2)	0.19
Recent antimicrobial use (1 month)	32 (50)	15 (37.5)	17 (70.8)	0.02
Previous MDR/XDR-PA colonization	15 (23.4)	4 (10)	11 (45.8)	<0.01
Charlson comorbidity index [median (IQR)]	2 (0–6)	2 (0–6)	2 (0–5)	0.41
Underlying condition				
Diabetes mellitus	27 (42.2)	16 (40)	11 (45.8)	0.79
Chronic pulmonary disease	8 (12.5)	6 (15)	2 (8.3)	0.70
Heart disease	13 (20.3)	9 (22.5)	4 (16.7)	0.75
Haematological malignancy	14 (21.8)	7 (17.5)	7 (29.2)	0.35
Solid malignancy	15 (23.4)	11 (27.5)	4 (16.7)	0.38
Chronic renal insufficiency	13 (20.3)	8 (20)	5 (20.8)	1.00
Immunosuppressive therapy	31 (48.4)	19 (47.5)	12 (50)	1.00
Neutropenia	19 (29.7)	11 (27.5)	8 (33.3)	0.78
Solid organ/Stem cell transplantation	14 (21.8)	6 (15)	8 (33.3)	0.12
Source of bacteraemia				
High-risk source	40 (62.5)	23 (57.5)	17 (70.8)	0.42
Unknown	8 (12.5)	4 (10)	4 (16.7)	0.46
Respiratory tract infection	15 (23.4)	7 (17.5)	8 (33.3)	0.22
Intra-abdominal infection	13 (20.3)	10 (25)	3 (12.5)	0.34
Skin and soft-tissue infection	4 (6.3)	2 (5)	2 (8.3)	0.63
Low-risk source	24 (37.5)	17 (42.5)	7 (29.2)	0.42
Vascular catheter	5 (7.8)	4 (10)	1 (4.2)	0.64
Urinary tract infection	19 (29.7)	13 (32.5)	6 (25)	0.58
Clinical presentation				
Pitt bacteraemia score ≥ 2	31 (48.4)	16 (40)	15 (62.5)	0.12
Septic shock	31 (48.4)	16 (40)	15 (62.5)	0.12
Appropriate empirical antibiotic therapy ^b	34 (53.1)	29 (72.5)	5 (20.8)	<0.01
Appropriate directed antibiotic therapy ^b	56 (87.5)	36 (90)	20 (83.3)	0.72
Additional therapy	21 (32.8)	12 (30)	9 (37.5)	0.59
Delay in appropriate therapy	16 (25)	7 (17.5)	9 (37.5)	0.13
Outcome				
48-h crude mortality	14 (21.8)	5 (12.5)	9 (37.5)	0.03
30-day crude mortality	27 (42.2)	12 (30)	15 (62.5)	0.02

MDR, multidrug-resistant; XDR, extensively drug-resistant; IQR, interquartile range; ICU, intensive care unit.

^a Patient carrying urinary/vascular catheters prior to the episode of bacteraemia.

^b These data do not consider patients who were given only palliative treatment (n = 2 at the onset of bacteraemia, n = 5 after 48 h).

performed using the SPSS statistical package, version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Results

3.1. Epidemiological and clinical characteristics

During 2016, a total of 70 episodes of *P. aeruginosa* bacteraemia were identified. Six episodes were excluded: 3 because the patients were younger than 18 years of age and 3 due to polymicrobial bacteraemia. Consequently, 64 bacteraemia episodes were analysed: 24 (37.5%) were caused by XDR-PA and 40 (62.5%) by non-XDR-PA (30 strains [75%] were moderately resistant and 10 strains [25%] were susceptible). The epidemiological and clinical characteristics of patients with *P. aeruginosa* bacteraemia by resistance phenotype are shown in Table 1. Compared with the non-XDR-PA episodes, XDR-PA cases were more frequently nosocomially acquired (70.8% vs. 40%; $P=0.02$) and were more often associated with previous antibiotic exposure (70.8% vs. 37.5%; $P=0.02$), previous MDR/XDR-PA colonization (45.8% vs. 10%; $P<0.01$) and inappropriate empirical antibiotic therapy (20.8% vs. 75%; $P<0.01$).

3.2. Microbiological and molecular results

The antimicrobial susceptibility patterns of XDR-PA isolates are shown in Table 2. These isolates were susceptible only to colistin (100%), amikacin (37.5%), ceftolozane-tazobactam (12.5%) and ceftazidime-avibactam (58.3%). PCR amplification revealed the presence of *bla*_{VIM-2} in 10 isolates, and *bla*_{GES-5} in 11 isolates. Only 3 XDR-PA isolates were non-carbapenemase producers. Genotyping of XDR-PA strains by PFGE showed 4 clonal clusters (A = 11, B = 10, C = 2, D = 1). GES-5-producing isolates belonged to pulsotype A, whereas VIM-2 producers belonged to pulsotype B. MLST analysis of XDR-PA clones A and B showed ST235 (GES-5-producing) and ST175 (VIM-2-producing). The *exoU*-positive genotype was detected in 17 (26.6%) *P. aeruginosa* bacteraemia strains, 11 (45.8%) of which were XDR-PA isolates, all belonging to the ST235 clone, and 6 (15%) were non-XDR-PA isolates. Ceftolozane-tazobactam was only active against the non-carbapenemase-producing XDR-PA strains. Also, ceftazidime-avibactam was active against GES-5 producers, but ineffective against VIM-2-producing strains (Table 2).

Table 2
Antimicrobial resistant patterns of clinical isolates of XDR-PA^a

Antimicrobial agent	XDR-PA (n=24)	MIC ₅₀ (mg/L)	ST175 clone (n=10)	MIC ₅₀ (mg/L)	ST235 clone (n=11)	MIC ₅₀ (mg/L)
Ceftazidime	24 (100)	>32	10 (100)	>32	11 (100)	>32
Cefepime	24 (100)	>16	10 (100)	>16	11 (100)	>16
Piperacillin-tazobactam	24 (100)	32	10 (100)	32	11 (100)	32
Imipenem ^b	24 (100)	>32	10 (100)	>32	11 (100)	>32
Meropenem ^b	24 (100)	>32	10 (100)	>32	11 (100)	>32
Aztreonam	24 (100)	16	10 (100)	8	11 (100)	16
Ciprofloxacin	24 (100)	>2	10 (100)	>2	11 (100)	>2
Gentamicin	24 (100)	>8	10 (100)	>8	11 (100)	>8
Tobramycin	24 (100)	>8	10 (100)	>8	11 (100)	>8
Amikacin	15 (62.5)	>32	0 (0)	8	11 (100)	>32
Colistin	0 (0)	≤2	0 (0)	≤2	0 (0)	≤2
Ceftrozone-tazobactam ^b	21 (87.5)	>256	10 (100)	>256	11 (100)	48
Ceftazidime-avibactam ^b	10 (41.7)	>256	10 (100)	>256	0 (0)	6

XDR, extensively drug-resistant; MIC, minimum inhibitory concentration.

^a Data are presented as the number (%) of isolates non-susceptible to the antibiotic indicated.^b MICs were determined by strip test.**Table 3**
Comparative analysis of ST175 clone and ST235 clone in XDR-PA bacteraemia.

Characteristic	ST175 clone (n=10)	ST235 clone (n=11)	P-value
Age (years) [median (IQR)]	59 (45–85)	57 (44–87)	0.55
Male sex	6 (60)	8 (72.7)	0.59
Location at time of culture			
Surgical ward	3 (30)	1 (9)	0.31
Intensive care unit	1 (10)	4 (36.4)	0.31
Haematology ward	4 (40)	2 (18.2)	0.36
Medical wards	2 (20)	4 (36.4)	0.64
Recent ICU admission (3 months)	0	4 (36.4)	0.09
Charlson comorbidity index [median (IQR)]	2 (1–5)	2 (2–4)	0.29
Underlying condition			
Diabetes mellitus	2 (20)	9 (82)	0.01
Chronic pulmonary disease	0	1 (9)	1.00
Heart disease	1 (10)	3 (27.3)	0.59
Haematological malignancy	4 (40)	3 (27.3)	0.66
Solid malignancy	2 (20)	1 (9)	0.59
Chronic renal insufficiency	3 (30)	1 (9)	0.31
Immunosuppressive therapy	5 (50)	5 (45.4)	1.00
Neutropenia	5 (50)	3 (27.3)	1.00
Solid organ/stem cell transplantation	3 (30)	3 (27.3)	1.00
Source of bacteraemia			
High-risk source	5 (50)	10 (90.1)	0.06
Unknown	2 (20)	2 (18.2)	1.00
Respiratory tract infection	2 (20)	6 (54.5)	0.18
Intra-abdominal infection	1 (10)	1 (9)	1.00
Skin and soft-tissue infection	0	1 (9)	1.00
Low-risk source	5 (50)	1 (9)	0.06
Vascular catheter	0	0	–
Urinary tract infection	5 (50)	1 (9)	0.06
Clinical presentation			
Pitt bacteraemia score ≥2	4 (40)	9 (82)	0.08
Septic shock	4 (40)	9 (82)	0.08
Appropriate empirical therapy ^a	3 (30)	2 (18.2)	0.64
Appropriate directed therapy ^a	7 (70)	10 (91)	0.31
Additional therapy	6 (60)	1 (9)	0.02
Delay of appropriate therapy >24 h	3 (30)	5 (45.5)	0.66
Virulence factor			
exoL-positive genotype	0	11 (100)	<0.01
Outcome			
48-h crude mortality	2 (20)	6 (54.5)	0.18
30-day crude mortality	3 (30)	9 (82)	0.03

IQR, interquartile range; ICU, intensive care unit.

^a These data do not consider patients who were given only palliative treatment (n = 2 at the onset of bacteraemia, n = 5 after 48 h).

3.3. ST235 versus ST175 clones in XDR-PA bacteraemia

Table 3 shows the epidemiological and clinical characteristics of patients with XDR-PA bacteraemia according to clonal diversity. Patients with infections caused by strains belonging to the ST235 clone were more likely to be hospitalized in the intensive care unit

(ICU; 36.4% vs. 0%; $P = 0.09$) and to have a high-risk source of bacteraemia (90% vs. 50%; $P = 0.06$), particularly the respiratory tract. Moreover, a trend towards a more severe clinical presentation was noted: patients with clone ST235 had higher Pitt bacteraemia scores and a higher frequency of septic shock at presentation (82% vs. 40%; $P = 0.08$).

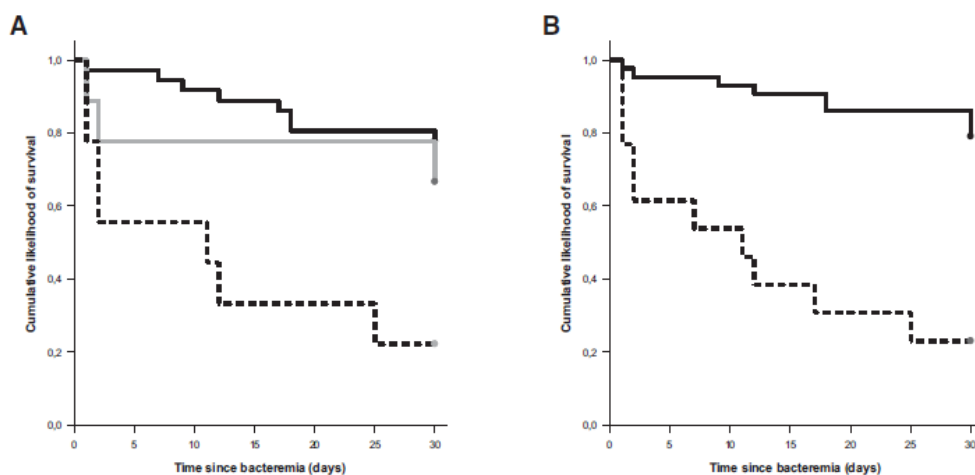


Fig. 1. Kaplan-Meier survival curves of patients with bacteraemia by *P. aeruginosa*. **A.** According to carbapenemase type: black continuous line, no carbapenemase; grey continuous line, VIM-2 carbapenemase; and black discontinuous line, GES-5 carbapenemase (log-rank test, $P < 0.001$). **B.** According to *exoU* genotype: black continuous line, *exoU*-negative; and black discontinuous line *exoU*-positive (log-rank test, $P < 0.001$).

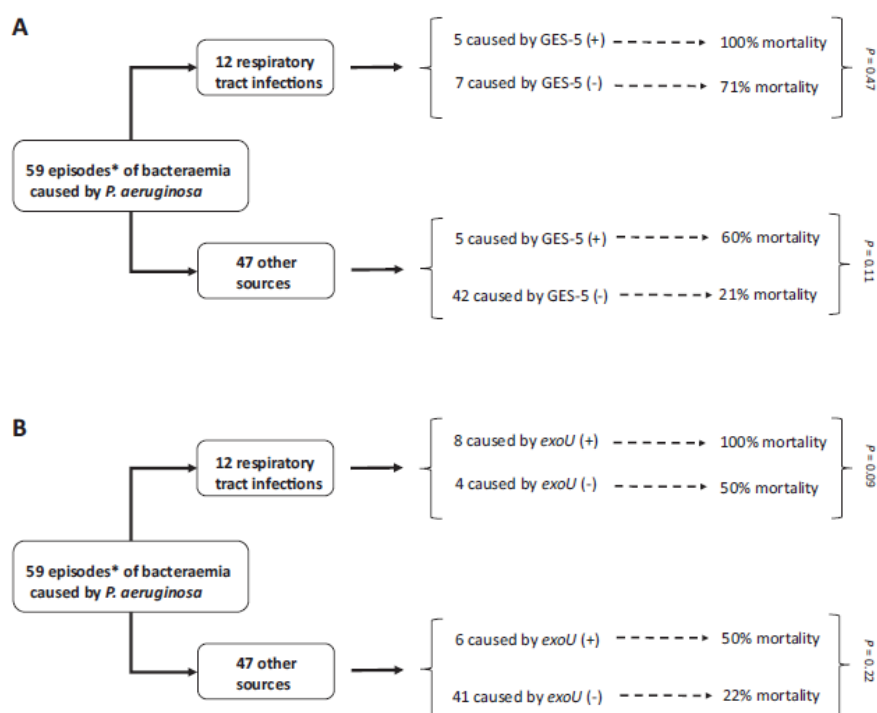


Fig. 2. Stratified analysis of the influence of GES-5-producing carbapenemase (panel A) and *exoU*-genotype (panel B) on 30-day crude mortality according to the source of bacteraemia. *Analysis performed on 59 patients, after excluding 5 who received only palliative treatment.

Table 4
Univariate and multivariate analyses of factors associated with 30-day crude mortality^a

Characteristic	Survived (n = 37)	Died (n = 22) ^b	P-value	aOR (95% CI)	P-value
Host-related factors					
Age (years) [median (IQR)]	68 (56–83)	61 (57–79)	0.57		
Male sex	26 (70.3)	12 (54.5)	0.27		
Recent ICU admission (3 months)	4 (10.8)	4 (18)	0.46		
Charlson comorbidity index	3 (1–4)	4 (3–5)	0.01	–	–
Diabetes mellitus	14 (37.8)	10 (46)	0.57		
Haematological malignancy	8 (21.6)	5 (23)	1.00		
Solid malignancy	7 (18.9)	7 (32)	0.26		
Neutropenia	11 (29.7)	7 (32)	0.87		
Respiratory tract source	2 (5.4)	10 (46)	<0.001	49.13 (3.89–620.5)	0.003
Urinary tract source	16 (43.2)	3 (14)	0.02	–	–
Pitt bacteraemia score ≥ 2	9 (24.3)	17 (77)	<0.001	42.31 (4.88–366.7)	0.001
Pathogen-related factors					
XDR phenotype	9 (24.3)	13 (59)	0.01	–	–
VIM-2-carbapenemase (ST175)	7 (18.9)	2 (9)	0.46		
GES-5-carbapenemase (ST235)	2 (5.4)	8 (36)	0.004	–	–
exoU-positive genotype	3 (8.1)	11 (50)	<0.001	–	–
Treatment-related factors					
Appropriate empirical therapy	23 (62.5)	11 (50)	0.42		
Appropriate directed therapy	34 (92)	22 (100)	0.29		
Delay of appropriate therapy >24h	8 (21.6)	8 (36.3)	0.22		

IQR, interquartile range; ICU, intensive care unit; XDR, extensively drug-resistant; aOR: adjusted Odds Ratio; 95%CI: 95% confidence intervals; –: variables included in the initial model of the multivariate analysis, then discarded in a stepwise backward selection process.

^a Five patients were excluded from the analysis because of palliative treatment (n=59).

^b In 18 patients who died within 30 days, death was considered related to the bacteraemia episode.

3.4. Outcome analysis and predictors of mortality

Crude mortality at 48 h and 30 days was 22% and 42%, respectively, and was significantly higher for XDR-PA episodes, both for 48 h (37.5% vs. 12.5%; $P=0.03$) and 30-day mortality (62.5% vs. 30%; $P=0.02$) (Table 1). In addition, 30-day crude mortality was significantly higher for ST235 isolates (82% vs. 30%; $P=0.03$) (Table 3). Mortality was considered to be attributable to the episode of infection in 23 patients (36% of all patients, 85% of all patients dying at 30 days) (Supplementary Table 1). Likewise, attributable mortality was significantly higher for XDR-PA episodes than for non-XDR cases (50% vs. 23%; $P=0.03$), and for ST235 isolates compared with ST175 strains (73% vs. 20%; $P=0.03$).

The results of univariate and multivariate analyses to identify predictors of 30-day crude mortality are shown in Table 4. GES-5 carbapenemase producers and an *exoU*-positive genotype were associated with a worse prognosis (Figure 1). Multivariate analysis showed that independent risk factors were Pitt score ≥ 2 (OR, 42.31; 95% CI 4.88–366.7, $P=0.001$) and respiratory tract source of bacteraemia (OR, 49.13; 95% CI 3.89–620.5, $P=0.003$). Similar results were observed in the analysis of crude mortality at 48 h. Stratified analysis adjusting for source of infection showed a trend towards a worse prognosis for GES-5-producing and *exoU*-producing *P. aeruginosa* (Figure 2). Of note, mortality among these patients was 100% when bacteraemia was secondary to a respiratory infection.

4. Discussion

This study reinforces the current idea that *P. aeruginosa* bacteraemia is an important clinical problem because of the high rate of antibiotic resistance and the high mortality observed [1]. Indeed, about 38% of the isolates that we examined had an XDR-PA phenotype, with most being susceptible only to colistin, amikacin, and/or ceftazidime-avibactam, the new cephalosporin- β -lactamase inhibitor combination. Furthermore, an important proportion of our XDR-PA isolates were VIM-2 and GES-5 carbapenemase

producers associated with the high-risk ST175 and ST235 clones, respectively. These findings are consistent with those previously reported by our centre [27,28]. The ST175 clone is the most common clone type found in European countries [2–4] and was widely disseminated in our hospital, whereas the ST235 clone should be considered a re-emerging clone in our centre. In addition, the strains belonging to the ST235 clone showed the hypervirulent *exoU*-positive genotype. Indeed, the spread of these XDR-PA isolates is worrisome, because the therapeutic arsenal is limited and directly impacts severity and mortality.

Thirty-day crude and attributable mortality among our patients was 42% and 36%, which is similar to rates reported in the literature [5,7,11,29,30]. We observed that severity at presentation and a respiratory tract source of bacteraemia were independent predictors of mortality, as has been reported previously [6–8,15]. We also observed a higher frequency of 30-day crude and attributable mortality (50% and 63%, respectively) among patients with XDR-PA bacteraemia, which is very troubling, given that most patients received prompt and active antibiotic therapy.

Whether the acquisition of antimicrobial resistance directly leads to increased mortality remains controversial. Although some studies have shown that MDR/XDR profiles result in higher mortality in the setting of *P. aeruginosa* bacteraemia [5–8], antimicrobial resistance frequently incurs a fitness cost, reducing virulence and disease severity [9]. In this regard, Gómez-Zorrilla et al. [9] elegantly showed in a murine model of peritonitis that several non-MDR-PA isolates were able to cause more severe, life-threatening infections than another subset of MDR-PA isolates. Interestingly, among the MDR-PA strains, there was one expressing *exoU*, which produced a slightly more virulent infection. Similarly, such effect on bacterial fitness has also been shown in several *in vitro* and *in vivo* models with *Acinetobacter baumannii* colistin-resistant strains [31,32].

The clinical experience presented here illustrates this phenomenon. A thorough analysis of our resistant strains enabled us to confirm that their clinical behaviour was quite heterogeneous, even though they shared a similar antimicrobial susceptibility

profile. Although the prognosis of the VIM-2-producing ST175 clone was similar to that of non-XDR-PA isolates, mortality associated with the GES-5-producing ST235 clone was significantly higher (Fig. 1A). A remarkable finding that contrasted with a recent study by Peña et al. [11] was the significant association between the *exoU*-positive genotype and XDR-PA strains, although, again, this association was at the expense of the ST235 clone. The type III secretion system protein, *ExoU*, is one of the major determinants of *P. aeruginosa* virulence and is associated with a hyper-virulent phenotype [10,11]. This probably accounts for the higher mortality observed with the ST235 clone in our series (Fig. 1B).

Indeed, there was a significant overlap of *exoU*-positive genotype, respiratory tract infection and severe clinical presentation, all these features associated to the ST235 clone. These results are in line with a recent study showing that the *exoU*-positive genotype was more frequently observed among *P. aeruginosa* isolated from respiratory samples from patients with pneumonia [33]. Thus, to prevent confounding, we performed a stratified analysis, adjusting for type of infection (respiratory vs. others) and still observed a non-significant trend towards a worse prognosis in patients with infection due to the GES-5 carbapenemase-producing ST235 clone and *exoU*-positive *P. aeruginosa* isolates (Fig. 2).

The high acquired determinants of antimicrobial resistance in the clone ST235 observed in our centre indicate local acquisition [27,28]. This high acquisition of foreign resistant determinants in ST235 may be the driving force behind the high level of resistance of our ST235 strains. In this regard, in a recent study based on the whole sequence genome analysis, it was observed that MDR/XDR-PA ST235 clone had a higher substitution rate, an additional type IV secretion system, and no functional CRISPR/CAS system. The authors suggested that these genetic traits might enable these bacteria to acquire exogenous genetic elements more efficiently, and to contribute to the emergence and spread of MDR/XDR-PA ST235 clone [34].

Overall, the present study provides evidence that the pathogenicity of *P. aeruginosa* may differ among strains with similar patterns of resistance, and could partly justify mortality rates being lower than expected according to epidemiological and estimation reports [35]. Although relatively infrequent so far, the potential coincidence of the MDR/XDR profile with the presence of certain virulence factors could be particularly dangerous for patients. Although the need for early active antimicrobial treatment may not be crucial in many MDR/XDR-PA strains with loss of fitness, it could be much more important against virulent MDR/XDR-PA isolates, such as the ST235 clone described in this analysis.

In this regard, it was somewhat disappointing to observe that ceftolozane-tazobactam was active against only 12.5% of XDR-PA isolates, but this could be explained by the elevated number of carbapenemase-producing *P. aeruginosa* strains found in our hospital. By contrast, ceftazidime-avibactam was active against 58.3% of XDR-PA isolates and, importantly, 100% of XDR-PA isolates belonging to clone ST235. Unfortunately, ceftazidime-avibactam was not fully available at the time of the study, so we were unable to analyse the influence of this antibiotic on the outcome. These results corroborate recent reports of decreased susceptibility to ceftolozane-tazobactam and ceftazidime-avibactam among *P. aeruginosa* isolates resistant to other β -lactams [12,13].

This study has the limitations of a retrospective analysis performed in a single centre. Thus, the data may not easily extrapolate to other locations with a different epidemiology. In addition, our limited sample size may have prevented us from finding significant differences between groups. In this regard, the low number of casualties observed in the first 48 h precluded the performance of multivariate analysis. Despite this, the results observed in univariate analysis were similar to those in the 30-day crude mortality

analysis. Also, the association between GES-5 carbapenemase and *exoU* production was too strong in this series for it to be analysed separately, so the specific leverage of each characteristic on mortality remains uncertain.

In conclusion, bacteraemia due to XDR-PA represents a serious clinical problem associated with a high mortality rate. Patients with respiratory tract infection, a severe clinical presentation, the GES-5-producing ST235 clone and *exoU*-positive *P. aeruginosa* isolates were at high risk of 30-day crude mortality. As the risk of dissemination of resistance mechanisms increases, understanding the local epidemiology of multidrug resistance will be particularly important, and this may have a significant impact on antibiotic policies, including the use of new combinations of broad-spectrum antibiotics. Moreover, *P. aeruginosa* virulence factors, particularly the *exoU* genotype, could be a useful predictor for identifying patients with an unfavourable prognosis.

Acknowledgements

The authors would like to thank Mar Aguilera, Antonia Martín, Mercedes Murcia, M^a Luz Santos, and Esther Zabala (Department of Clinical Microbiology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain) for technical assistance. The authors also thank Janet Dawson for reviewing the English.

Declarations

Funding

This study was supported by the Plan Nacional de I+D+i 2008–2011 and the Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad (Spanish Network for Research in Infectious Diseases REIPI RD 16/0016), co-financed by European Development Regional Fund (ERDF). E. Viedma was supported by "Rio Hortega" fellowship grant (Instituto de Salud Carlos III).

Competing Interests

None

Ethical Approval

The Research Ethics Committee of our centre (Health Research Institute, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain) approved the study (TP17/0041).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.03.018.

References

- [1] Thaden JT, Park LP, Maskarinec SA, Ruffin F, Fowler VG, van Duin D. Results from a 13-year prospective cohort study show increased mortality caused by *Pseudomonas aeruginosa* compared to other bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:1–11.
- [2] Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat* 2015;21–22:41–59. doi:10.1016/j.drug.2015.08.002.
- [3] Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, et al. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:6349–57. doi:10.1128/AAC.01388–12.
- [4] Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Zamorano L, Juan C, et al. Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:5527–35. doi:10.1128/AAC.01481–13.

- [5] Peña C, Suarez C, Gozalo M, Murillas J, Almirante B, Pomar V, et al. Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:1265–72. doi:10.1128/AAC.05991-11.
- [6] Suárez C, Peña C, Gavalda L, Tubau F, Manzur A, Domínguez MA, et al. Influence of carbapenem resistance on mortality and the dynamics of mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *Int J Infect Dis* 2010;14(Suppl 3):e73–8. doi:10.1016/j.ijid.2009.11.019.
- [7] Kang CI, Kim SH, Kim HB, Park SW, Choe YJ, Oh MD, et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin Infect Dis* 2003;37:745–51. doi:10.1086/377200.
- [8] Tam VH, Rogers CA, Chang KT, Weston JS, Caeiro JP, Garey KW, et al. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia on patient outcomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:3717–22. doi:10.1128/AAC.00207-10.
- [9] Gómez-Zorrilla S, Juan C, Cabot G, Camoez M, Tubau F, Oliver A, et al. Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: In vitro and in vivo studies. *Int J Antimicrob Agents* 2016;47:368–74. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.02.010.
- [10] Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:654–65. doi:10.1038/nrmicro2199.
- [11] Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, et al. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 2015;60:539–48. doi:10.1093/cid/ciu866.
- [12] Tato M, García-Castillo M, Bofarull AM, Cantón R, Study Group CENIT. In vitro activity of ceftolazone/tazobactam against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae recovered in Spanish medical centres: Results of the CENIT study. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46:502–10. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.07.004.
- [13] Buehrle DJ, Shields RK, Chen L, Hao B, Press EG, Alkrouk A, et al. Evaluation of the in vitro activity of ceftazidime-avibactam and ceftolazone-tazobactam against meropenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:3227–31. doi:10.1128/AAC.02969-15.
- [14] Joo EJ, Kang CI, Ha YE, Kang SJ, Park SY, Chung DR, et al. Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: clinical impact of antimicrobial resistance on outcome. *Microb Drug Resist* 2011;17:305–12. doi:10.1089/mdr.2010.0170.
- [15] Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, et al. Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:760–6. doi:10.1128/AAC.49.2.760.
- [16] Peña C, Suarez C, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, et al. Effect of adequate single-drug vs combination antimicrobial therapy on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: A post hoc analysis of a prospective cohort. *Clin Infect Dis* 2013;57:208–16. doi:10.1093/cid/cit223.
- [17] Morata L, Cobos-Trigueros N, Martínez JA, Á Soriano, Almela M, Marco F, et al. Influence of multidrug resistance and appropriate empirical therapy on the 30-day mortality rate of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:4833–7. doi:10.1128/AAC.00750-12.
- [18] Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, et al. Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med* 2002;137:791–7. doi:10.1097/00019048-200206000-00016.
- [19] Blot S, Vandewoude K, De Bacquer D, Colardyn F. Nosocomial bacteremia caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria in critically ill patients: clinical outcome and length of hospitalization. *Clin Infect Dis* 2002;34:1600–6. doi:10.1086/340616.
- [20] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–81. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- [21] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992;101(6):1644–55. doi:10.1378/chest.101.6.1644.
- [22] Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, Quinn JP, Hooper DC, Johnson MP, et al. Enterobacter bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann Intern Med* 1991;115:585–90. doi:10.7326/0003-4819-115-8-585.
- [23] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 7.0, 2017. 2017.
- [24] Feltman H, Schult G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2001;147:2659–69. doi:10.1099/00222787-147-10-2659.
- [25] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233–9. doi:10.1093/0095-1137.
- [26] Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2004;42:5644–9. doi:10.1128/JCM.42.12.5644.
- [27] Viedma E, Juan C, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F, et al. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum β -lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4930–3. doi:10.1128/AAC.00900-09.
- [28] Viedma E, Juan C, Villa J, Barrado L, Orellana MA, Sanz F, et al. VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone. Spain. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1235–41. doi:10.3201/eid1808.111234.
- [29] Hattner A, Hauser A, Diaz M, Scheetz M, Shah N, Allen JP, et al. Bacterial and clinical characteristics of health care- and community-acquired bloodstream infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:3969–75. doi:10.1128/AAC.02467-12.
- [30] Buehrle DJ, Shields RK, Clarke LG, Potoski BA, Clancy CJ, Nguyen MH. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and microbiologic treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61. doi:10.1128/AAC.01243-16.
- [31] Hraiech S, Roch A, Lepidi H, Atieh T, Audoly G, Rolain JM, et al. Impaired virulence and fitness of a colistin-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in a rat model of pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:5120–1. doi:10.1128/AAC.00700-13.
- [32] López-Rojas R, Domínguez-Herrera J, McConnell MJ, Docobo-Peréz F, Smani Y, Fernández-Reyes M, et al. Impaired virulence and in vivo fitness of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis* 2011;203:545–8. doi:10.1093/infdis/jiq086.
- [33] Sullivan E, Bensman J, Lou M, Agnello M, Shriner K, Wong-Beringer A. Risk of developing pneumonia is enhanced by the combined traits of fluoroquinolone resistance and type III secretion virulence in respiratory isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med* 2014;42:48–56. doi:10.1097/CCM.0b013e318298a86f.
- [34] Miyoshi-Akiyama T, Tada T, Ohmagari N, Viet Hung N, Tharavichitkul P, Pokhrel BM, et al. Emergence and spread of epidemic multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Biol Evol* 2017;9:3238–45. doi:10.1093/gbe/evx243.
- [35] Abat C, Rolain JM, Dubourg G, Fournier PE, Chaudet H, Raoult D. Evaluating the clinical burden and mortality attributable to antibiotic resistance: the disparity of empirical data and simple model estimations. *Clin Infect Dis* 2017;65:558–63. doi:10.1093/cid/cix346.



Predictors of Mortality in Bloodstream Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* and Impact of Antimicrobial Resistance and Bacterial Virulence

Raúl Recio,^a Mikel Mancheño,^b Esther Viedma,^a Jennifer Villa,^a María Ángeles Orellana,^a Jaime Lora-Tamayo,^b Fernando Chaves^a

^aDepartment of Clinical Microbiology, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

^bDepartment of Internal Medicine, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

ABSTRACT Whether multidrug resistance (MDR) is associated with mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections (BSI) remains controversial. Here, we explored the prognostic factors of *P. aeruginosa* BSI with emphasis on antimicrobial resistance and virulence. All *P. aeruginosa* BSI episodes in a 5-year period were retrospectively analyzed. The impact in early (5-day) and late (30-day) crude mortality of host, antibiotic treatment, and pathogen factors was assessed by multivariate logistic regression analysis. Of 243 episodes, 93 (38.3%) were caused by MDR-PA. Crude 5-day (20%) and 30-day (33%) mortality was more frequent in patients with MDR-PA (34.4% versus 11.3%, $P < 0.001$ and 52.7% versus 21.3%, $P < 0.001$, respectively). Early mortality was associated with neutropenia (adjusted odds ratio [aOR], 9.21; 95% confidence interval [CI], 3.40 to 24.9; $P < 0.001$), increased Pitt score (aOR, 2.42; 95% CI, 1.34 to 4.36; $P = 0.003$), respiratory source (aOR, 3.23; 95% CI, 2.01 to 5.16; $P < 0.001$), inadequate empirical therapy (aOR, 4.57; 95% CI, 1.59 to 13.1; $P = 0.005$), shorter time to positivity of blood culture (aOR, 0.88; 95% CI, 0.80 to 0.97; $P = 0.010$), an *exoU*-positive genotype (aOR, 3.58; 95% CI, 1.31 to 9.79; $P = 0.013$), and the O11 serotype (aOR, 3.64; 95% CI, 1.20 to 11.1; $P = 0.022$). These risk factors were similarly identified for late mortality, along with an MDR phenotype (aOR, 2.18; 95% CI, 1.04 to 4.58; $P = 0.040$). Moreover, the O11 serotype (15.2%, 37/243) was common among MDR (78.4%, 29/37) and *exoU*-positive (89.2%, 33/37) strains. Besides relevant clinical variables and inadequate empirical therapy, pathogen-related factors such as an MDR phenotype, an *exoU*-positive genotype, and the O11 serotype adversely affect the outcome of *P. aeruginosa* BSI.

KEYWORDS *Pseudomonas aeruginosa*, bloodstream infections, antimicrobial resistance, virulence, mortality

Pseudomonas aeruginosa is a severe cause of bloodstream infections (BSI), with mortality rates above 30%, despite advances in medical care (1, 2). The presence of underlying diseases, the source of infection, and the severity of acute presentation are key host factors modulating prognosis (3, 4). Delayed adequate antimicrobial therapy is also independently associated with increased mortality (5, 6). In addition, pathogen-related factors, such as antimicrobial resistance and virulence traits are crucial elements which may affect the clinical outcomes of *P. aeruginosa* infections (7).

In this regard, a concern for *P. aeruginosa* infections is in the global emergence of multidrug resistant (MDR) and extensively drug resistant (XDR) strains, which limit the selection of effective antimicrobial therapies (8, 9). Successful selection of chromosomal mutations and the growing acquisition of transferable resistance determinants, particularly those encoding carbapenemases (e.g., GES, VIM, or IMP), are responsible for this

Citation Recio R, Mancheño M, Viedma E, Villa J, Orellana MA, Lora-Tamayo J, Chaves F. 2020. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and impact of antimicrobial resistance and bacterial virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e01759-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01759-19>.

Copyright © 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Jaime Lora-Tamayo, jaime@lora-tamayoes.com.

Received 28 August 2019

Returned for modification 14 October 2019

Accepted 11 November 2019

Accepted manuscript posted online 25 November 2019

Published 27 January 2020

increasing threat (10). Of note, some MDR/XDR strains, denominated high-risk clones, have a clonal epidemic population structure with limited sequence types (ST111, ST175, ST235) and a well-described ability to disseminate and cause severe infections (11, 12). However, despite the global spread of these high-risk clones, the real impact of multidrug resistance is still controversial. In many cases, MDR *P. aeruginosa* strains incur biological costs that compromise their pathogenic potential (13). However, this effect may vary significantly depending on the specific genetic context of the strains (14).

P. aeruginosa employs the toxins of the type III secretion system (TTSS) to interact with specific host targets and establish infection (15). Of the four TTSS effector proteins (ExoS, ExoT, ExoU, and ExoY), ExoU has been associated with poor outcomes in both clinical and experimental studies (16–19). In addition, it has been reported that some *P. aeruginosa* strains expressing lipopolysaccharide O-antigen serotypes, such as O1 and O11, may induce a worse prognosis in respiratory tract infections (20, 21). However, the correlation between resistance phenotype, TTSS genotype, and O serotype, and how these impact *P. aeruginosa* BSI, has not been consistently explored in clinical studies.

The assessment of host, pathogen, and treatment factors, which may account for the severity and mortality of *P. aeruginosa* BSI, may be of help in improving patient outcomes. Thus, the main objective of this study was to explore the prognostic factors affecting mortality in a large cohort of patients with *P. aeruginosa* BSI, with an emphasis on antimicrobial resistance and virulence.

(The preliminary results of this study were presented as a poster presentation at the XXIII Congress of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC), Madrid, Spain, 23 to 25 May 2019.)

RESULTS

Among 294 patients with *P. aeruginosa* BSI, 51 were excluded from the study owing to polymicrobial bacteremia ($n = 25$), an age of less than 18 years ($n = 17$), or incomplete clinical or microbiological information ($n = 9$). Finally, 243 patients with laboratory-confirmed *P. aeruginosa* BSI were included in this study (Fig. 1).

MDR versus non-MDR phenotype. An MDR phenotype was documented in 93 (38.3%) isolates (87 [93.5%] were XDR and 6 [6.5%] were MDR non-XDR), while a non-MDR phenotype was observed in 150 (61.7%) isolates (127 [84.7%] were moderately resistant and 23 [15.3%] were multidrug susceptible). The main variables related to the MDR phenotype are detailed in Table 1. Patients with an MDR phenotype had a greater proportion of respiratory infections (35.5% versus 14.7%, $P < 0.001$) with a higher Pitt score (2 [1 to 3] versus 2 [0 to 3], $P = 0.069$) and septic shock (34.4% versus 22.7%, $P = 0.064$), compared to those with a non-MDR phenotype. Combined empirical antimicrobial therapy was used in 47.7% of cases and showed higher odds of being adequate in comparison with monotherapy (79.3% versus 49.6%, $P < 0.001$). Of note, inadequate empirical antimicrobial therapy was higher in patients with an MDR phenotype (59.1% versus 20.0%, $P < 0.001$). Moreover, an MDR phenotype determined significant differences in both early (34.4% versus 11.3%, $P < 0.001$) and late crude mortality (52.7% versus 21.3%, $P < 0.001$) (Fig. S1A and S1D in the supplemental material).

Antimicrobial susceptibility testing results for *P. aeruginosa* isolates are displayed in Table 2. Most XDR isolates were susceptible only to colistin (100%), amikacin (56.3%), and ceftazidime-avibactam (49.4%). For XDR strains, the most commonly identified carbapenemase was VIM-2 (43 strains [18.0%]), followed by GES-5 (33 strains [13.6%]). Pulsed-field gel electrophoresis showed two major epidemic clonal lineages within XDR strains (A = 33 and B = 43). Multilocus sequence typing analysis revealed that these XDR strains were frequently linked to high-risk clones, including ST175 (43 strains [18.0%]) and ST235 (33 strains [13.6%]). Table S1 shows a comparative analysis between MDR/XDR ST175 and ST235 high-risk clones. Patients with BSI caused by strains belonging to the ST235 clone presented a more severe clinical presentation and a poorer prognosis. Ceftolozane-tazobactam was

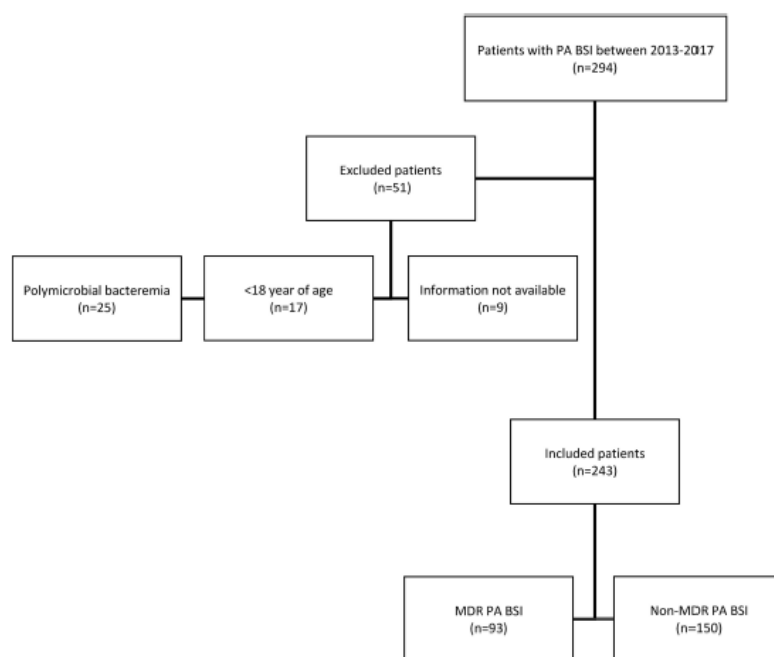


FIG 1 Study flow diagram. Non-duplicated clinical isolates from *P. aeruginosa* bloodstream infection patients between 2013 and 2017. Only the first episode of bacteremia recorded for each individual patient was included. MDR, multidrug resistant; PA, *P. aeruginosa*; BSI, bloodstream infections.

only active against the noncarbapenemase-producing strains. Also, ceftazidime-avibactam was only active against GES-5 carbapenemase-producing isolates.

exoU-positive versus exoU-negative genotype. The presence of *exoT* and *exoY* genes was documented in most strains (235 [96.7%] and 227 [93.4%], respectively). Concomitantly, all strains were positive for either *exoU* or *exoS* genes (50 [20.6%] and 185 [76.1%], respectively), except for 8 (3.3%) strains that were negative for both genes. The main variables related to the *exoU* genotype are shown in Table S2. Patients with an *exoU*-positive genotype had a greater proportion of respiratory infections (36.0% versus 19.2%, $P = 0.019$) with a higher Pitt score (3 [1 to 4] versus 2 [0 to 3], $P = 0.035$) and septic shock (52.0% versus 20.7%, $P < 0.001$), compared to the *exoU*-negative genotype. Likewise, an *exoU*-positive genotype determined significant differences in both early (40.0% versus 15.0%, $P < 0.001$) and late (60.0% versus 26.4%, $P < 0.001$) crude mortality (Fig. S1B and S1E). Because *exoT* and *exoY* genotypes were mostly positive, these genes were not included in the analysis.

O11 versus non-O11 serotypes. The O-antigen serotype was documented in most strains (213 [87.7%]), while 30 (12.3%) isolates were nontypeable. The most prevalent serotype was O4 (50 [20.6%]) followed by O1 (38 [15.6%]), O6 (38 [15.6%]), and O11 (37 [15.2%]) serotypes. The main characteristics according to O-antigen serotype are shown in Fig. 2. Patients infected with O11 serotype strains had a greater proportion of high-risk sources (78.4% versus 58.7%, $P = 0.027$), chiefly respiratory source, with a higher Pitt score (3 [2 to 3] versus 2 [0 to 3], $P = 0.012$) and septic shock (54.1% versus 22.3%, $P < 0.001$) compared to other O serotypes. In addition, there was a significant increase in 5-day and 30-day crude mortality in patients with an O11 serotype BSI

TABLE 1 Comparative analysis of cases with MDR and non-MDR bloodstream infections caused by *P. aeruginosa*

Variable ^a	Total ^{a,d}	MDR ^b	Non-MDR ^c	P
Median age (IQR)	66.0 (55.0–77.0)	63.0 (55.0–73.0)	67.0 (55.0–78.0)	0.079
No. (%) of males	161 (66.3)	56 (60.2)	105 (70.0)	0.153
Comorbidity				
Charlson comorbidity index	2 (2–3)	2 (2–4)	2 (1–3)	0.513
No. diabetes mellitus (%)	63 (25.9)	31 (33.3)	32 (21.3)	0.054
No. end-stage renal disease (%)	41 (16.9)	12 (12.9)	29 (19.3)	0.261
No. solid malignancy (%)	50 (20.6)	19 (20.4)	31 (20.7)	0.965
No. hematological malignancy (%)	62 (25.5)	31 (33.3)	31 (20.7)	0.040
No. severe neutropenia (%)	58 (23.9)	30 (32.3)	28 (18.7)	0.024
No. transplant (%)	52 (21.4)	19 (20.4)	33 (22.0)	0.897
No. prior MDR colonization (%)	34 (13.9)	31 (33.3)	3 (2.0)	<0.001
No. ICU admission in previous 3 mo. (%)	44 (18.1)	17 (18.3)	27 (18.0)	0.956
Prior invasive procedures				
No. venous catheter (%)	146 (60.1)	70 (75.3)	76 (50.7)	<0.001
No. urinary catheter (%)	107 (44.0)	41 (44.1)	66 (44.0)	0.989
No. mechanical ventilation (%)	36 (14.8)	17 (18.3)	19 (12.7)	0.312
No. surgery in previous mo. (%)	81 (33.3)	37 (39.8)	44 (29.3)	0.124
No. antimicrobial therapy in previous mo. (%)	170 (69.9)	82 (88.2)	88 (58.7)	<0.001
No. carbapenems (%)	54 (22.2)	36 (38.7)	18 (12.0)	<0.001
No. fluoroquinolones (%)	52 (21.4)	29 (31.2)	23 (15.3)	0.006
Acquisition type				
No. nosocomial (%)	137 (56.4)	71 (76.3)	66 (44.0)	<0.001
No. healthcare-associated (%)	82 (33.7)	22 (23.7)	60 (40.0)	0.013
No. community (%)	24 (9.9)	0 (0)	24 (16.0)	<0.001
Ward of admission				
No. medical (%)	120 (49.4)	29 (31.2)	91 (60.7)	<0.001
No. onco-hematological (%)	51 (21.0)	28 (30.1)	23 (15.3)	0.009
No. surgical (%)	29 (11.9)	14 (15.1)	15 (10.0)	0.328
No. critical care (%)	43 (17.7)	22 (23.7)	21 (14.0)	0.081
Primary source of infection				
No. high-risk source (%)	150 (61.7)	67 (72.0)	83 (55.3)	0.014
No. unknown (%)	26 (10.7)	8 (8.6)	18 (12.0)	0.536
No. respiratory (%)	55 (22.6)	33 (35.5)	22 (14.7)	<0.001
No. abdominal (%)	50 (20.6)	21 (22.6)	29 (19.3)	0.656
No. soft tissue (%)	19 (7.8)	5 (5.4)	14 (9.3)	0.330
Low-risk source	93 (38.3)	26 (27.9)	67 (44.7)	0.014
No. urinary (%)	67 (27.6)	18 (19.4)	49 (32.7)	0.035
No. vascular catheter (%)	23 (9.5)	7 (7.5)	16 (10.7)	0.557
No. other (%)	3 (1.2)	1 (1.1)	2 (1.3)	1.000
Clinical presentation				
No. Pitt bacteremia score ≥ 2 (%)	135 (55.6)	60 (64.5)	75 (50.0)	0.038
No. septic shock (%)	66 (27.2)	32 (34.4)	34 (22.7)	0.064
No. inadequate empiric antibiotic (%)	85 (34.9)	55 (59.1)	30 (20.0)	<0.001
Carbapenemase type/ST				
No. VIM-2/ST175 (%)	43 (17.7)	43 (46.2)	0 (0)	<0.001
No. GES-5/ST235 (%)	33 (13.6)	33 (35.5)	0 (0)	<0.001
TTSS genotype				
No. <i>exoU</i> +/ <i>exoS</i> – (%)	50 (20.6)	33 (35.5)	17 (11.3)	<0.001
No. <i>exoU</i> –/ <i>exoS</i> + (%)	185 (76.1)	59 (63.4)	126 (84.0)	<0.001
No. <i>exoU</i> –/ <i>exoS</i> – (%)	8 (3.3)	1 (1.1)	7 (4.7)	0.001
O-antigen serotype				
No. O1 (%)	38 (15.6)	8 (8.6)	30 (20.0)	0.028
No. O4 (%)	50 (20.6)	44 (47.3)	6 (4.0)	<0.001
No. O6 (%)	38 (15.6)	6 (6.5)	32 (21.3)	<0.001

(Continued on next page)

TABLE 1 (Continued)

Variable ^a	Total ^{a,d}	MDR ^b	Non-MDR ^c	P
No. O11 (%)	37 (15.2)	29 (31.2)	8 (5.3)	<0.001
No. other O-types (%)	80 (32.9)	6 (6.5)	74 (49.3)	<0.001
Median TTP (hours) of blood culture (IQR) ^f	16.0 (12.0–19.0)	16.0 (12.0–19.0)	15.0 (12.0–18.0)	0.553
Outcome				
No. 5-day mortality (early mortality) (%)	49 (20.2)	32 (34.4)	17 (11.3)	<0.001
No. 30-day mortality (late mortality) (%)	81 (33.3)	49 (52.7)	32 (21.3)	<0.001

^aTotal cases; *n* = 243, 100%.^bCases with MDR infections; *n* = 93, 38.3%.^cCases with non-MDR infections; *n* = 150, 61.7%.^dData are expressed as *n* (%) or median (IQR).^eMDR, multidrug-resistant; ICU, intensive care unit; ST, sequence type; TTSS, type III secretion system; TTP, time to positivity.^fTime from the start of incubation to the alert signal in the blood culture system.

compared to other O serotypes (48.6% versus 15.0%, $P < 0.001$ and 67.6% versus 27.2%, $P < 0.001$, respectively) (Fig. S1C and S1F).

Association between O-antigen serotype, resistance phenotype, and TTSS genotype. As shown in Fig. 2, serotypes O4 and O11 were more frequently associated with an MDR phenotype than were other O serotypes (88.0% versus 25.4%, $P < 0.001$ and 78.4% versus 31.1%, $P < 0.001$, respectively). In fact, within the MDR phenotype, a significant association was observed between O4 and O11 serotypes and the XDR phenotype (86.0% versus 22.8%, $P < 0.001$ and 78.4% versus 28.2%, $P < 0.001$, respectively). Likewise, within the XDR phenotype, the O4 serotype was identified in all the VIM-2/ST175 (43 [100%]) strains and the O11 serotype in most of GES-5/ST235 (29 [87.9%]) strains. Concomitantly, the O11 serotype was more frequently associated with the *exoU*-positive genotype than other O serotypes (89.2% versus 8.3%, $P < 0.001$). In contrast, O4 and O6 serotypes were more frequently associated with the *exoU*-negative genotype than were other O serotypes (100% versus 70.0%, $P < 0.001$ and 94.7% versus 72.5%, $P = 0.002$, respectively). In summary, the O4 serotype was strongly associated with the XDR phenotype (VIM-2/ST175 clone) and the *exoU*-negative genotype, whereas the O11 serotype was positively linked to the XDR phenotype (GES-5/ST235 clonal complex) and the *exoU*-positive genotype.

5-day and 30-day crude mortality. Outcome was able to be evaluated in 240 patients (98.8%). Among them, 46 (19.2%) died within 5 days. Univariate and multivariate analyses are shown in Table 3 and Table 4. A statistically significant inverse “dose-response” effect was observed between the time to positivity of blood culture and the mortality rate (Fig. S2). Because an interconnected nature has been observed of pathogen-related factors, which can result in collinearity, we performed a multivariate analysis using three separate models, including either the MDR phenotype or adequate empirical therapy, and the *exoU* genotype or O11 serotype. After adjustment for significant variables, host factors, including neutropenia, primary infection of respiratory tract, increased Pitt score, and a shorter time to positivity of blood culture, showed a significant association with increased 5-day mortality in all three models. In addition, inadequate empirical antimicrobial treatment (aOR, 4.57; 95% CI, 1.59 to 13.1; $P = 0.005$), along with infection by an *exoU*-positive strain (aOR, 3.58; 95% CI, 1.31 to 9.79; $P = 0.013$), or by an O11 serotype strain (aOR, 3.64; 95% CI, 1.20 to 11.1; $P = 0.022$), proved to be independent predictors of 5-day mortality in each model. Bacteremia by an MDR isolate showed a trend toward higher mortality when adjusted by other parameters (aOR, 2.39; 95% CI, 0.97 to 5.87; $P = 0.057$).

Seventy-eight (32.5%) patients died within 30 days. Similar risk factors for 30-day mortality were observed in the univariate and multivariate analyses (Table 3 and Table 4). The MDR phenotype proved to be an independent risk factor for mortality (aOR, 2.18; 95% CI, 1.04 to 4.58; $P = 0.040$). Again, a shorter time to positivity of blood culture was associated with higher mortality. Of interest, the nosocomial acquisition of bacteremia proved to be an independent predictor of 30-day mortality (aOR, 1.62; 95% CI,

TABLE 2 Antimicrobial susceptibility data for the 243 isolates of *P. aeruginosa* causing bloodstream infections

Isolate type (no.) ^a	No. of isolates susceptible to the indicated antibiotic (MIC [mg/liter]) (%):												
	PIP/TZ (≤16)	CAZ (≤8)	FEP (≤8)	ATM (≤16)	IMP (≤4)	MER (≤2)	GEN (≤4)	TOB (≤4)	AMI (≤8)	CIP (≤0.5)	COL (≤2)	TOL/TZ (≤4)	CAZ/AVI (≤8)
All (243)	154 (63.4)	152 (62.6)	152 (62.6)	26 (10.7)	144 (59.3)	144 (59.3)	157 (64.6)	163 (67.1)	205 (84.4)	133 (54.7)	243 (100)	10 (11.2)	43 (49.4)
MDR (93)													
Non-XDR (6)	2 (33.3)	2 (33.3)	2 (33.3)	0 (0)	4 (66.7)	5 (91.7)	5 (91.7)	5 (91.7)	6 (100)	4 (66.7)	6 (100)	ND	ND
XDR (87)	2 (2.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (4.5)	9 (10.1)	49 (56.3)	0 (0)	87 (100)	10 (11.2)	43 (49.4)
VIM-2/ST175 (43)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	43 (100)	0 (0)	43 (100)	0 (0)	0 (0)
GES-5/ST235 (33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	33 (100)	0 (0)	33 (100)
Others ^c (11)	2 (18.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (36.4)	9 (81.8)	6 (54.5)	0 (0)	11 (100)	10 (90.9)	10 (90.9)
Non-MDR (150)													
ModR (127)	127 (100)	127 (100)	127 (100)	3 (2.3)	117 (92.2)	116 (91.3)	125 (98.4)	126 (99.2)	127 (100)	106 (83.4)	127 (100)	ND	ND
Multis (23)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	ND	ND

PIP/TZ, piperacillin-tazobactam; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; IMP, imipenem; MER, meropenem; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; AMI, amikacin; CIP, ciprofloxacin; COL, colistin; TOL/TZ, ceftolozane-tazobactam; CAZ/AVI, ceftazidime-avibactam; ND, not done.

ModR, multidrug resistant; XDR, extensively drug resistant; ModR, moderately resistant; MultiS, multidrug susceptible; ST, sequence type.

Even more extensively drug-resistant *P. aeruginosa* isolates had no carbapenemase genes (*bla*GES, *bla*VIM, or *bla*IMP) identified.

^a PIP/TZ, piperacillin-tazobactam; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; IMP, imipenem; MER, meropenem; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; AMI, amikacin; CIP, ciprofloxacin; COL, colistin; TOL/TZ, ceftolozane-tazobactam; CAZ/AVI, ceftazidime-avibactam; ND, not done.

^b MDR, multidrug resistant; XDR, extensively drug resistant; ModR, moderately resistant; Multis, multidrug susceptible; ST, sequence type.

^c Eleven extensively drug-resistant *P. aeruginosa* isolates had no carbapenemase genes (*bla*GES, *bla*NDM, or *bla*IMP) identified.

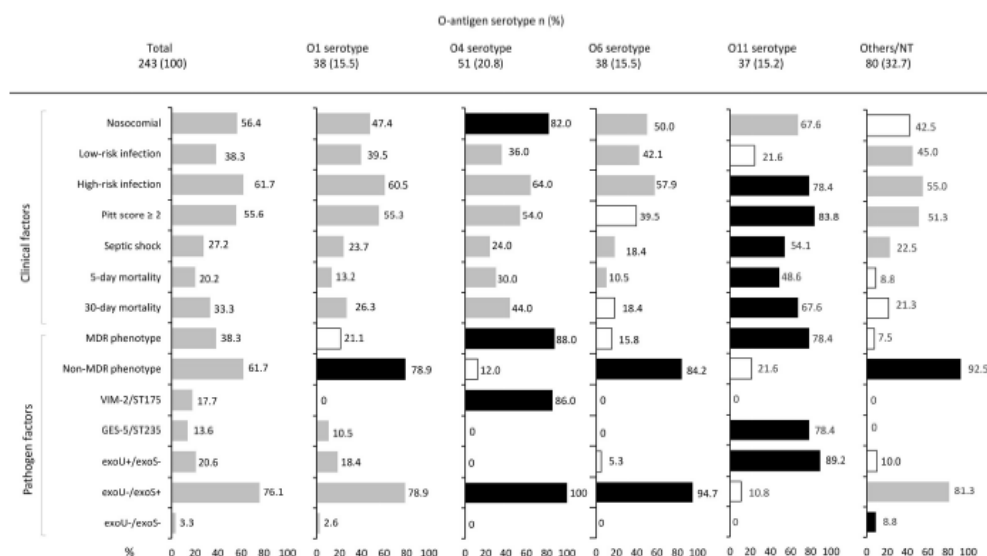


FIG 2 Clinical and pathogen factors in *P. aeruginosa* isolates from bloodstream infection patients according to O-antigen serotype. The proportion of isolates for each variable is indicated in the bar chart. Statistical significance ($P \leq 0.05$) by χ^2 or Fisher test is represented by colored bars (black, more prevalent; white, less prevalent). MDR, multidrug resistant; NT, nontypeable.

1.10 to 2.37; $P = 0.012$). A stratified analysis according to MDR phenotype revealed that an *exoU*-positive genotype and O11 serotype were associated with increased 30-day mortality both in patients with an MDR phenotype (log-rank test, $P = 0.011$ and $P = 0.007$) and a non-MDR phenotype (log-rank test, $P = 0.021$ and $P = 0.008$) (Fig. 3).

DISCUSSION

In this study, we have performed a detailed clinical and microbiological investigation to explore the risk factors affecting the prognosis of *P. aeruginosa* BSI. Our results confirm the high mortality associated with this infection, with 20% and 33% of patients dying within the first 5 and 30 days, respectively. This finding is consistent with recent data showing the high lethality of this condition compared with bacteremia caused by other microorganisms (22). We have shown that the poor observed outcome is the result of dynamic factors operating at the level of the host, the microorganism, and the antimicrobial therapy (14). With respect to the pathogen, both the development of antimicrobial resistance and its virulence must be addressed in order to have a complete perspective on the clinical problem.

After adjustment for potential confounders, our results suggest that patients with an MDR *P. aeruginosa* BSI have about roughly twice the odds of dying compared to patients infected with non-MDR isolates. Several studies have identified an association between antimicrobial resistance and an adverse clinical prognosis (1, 3, 5). However, the real impact of multidrug resistance is not so well established. In many cases, acquisition of antimicrobial resistance may be accompanied by a fitness cost and decreased virulence, therefore reducing disease severity and consequently mortality (7, 13, 14). However, this effect may vary significantly depending on the specific genetic context of the involved strains (14). Data presented here suggest that *P. aeruginosa* pathogenicity not only depends on the fitness cost of antimicrobial resistance, but also on the presence of some virulence determinants such as the TTSS genotype and the lipopolysaccharide O-antigen serotype.

TABLE 3 Univariate analysis of predictors factors for 5-day and 30-day crude mortality of patients with *P. aeruginosa* bloodstream infections.

Variable ^a	Early mortality (5-day) ^a			Late mortality (30-day) ^a		
	Nonsurvivors ^a	Survivors ^b	P	Nonsurvivors ^c	Survivors ^d	P
Median age (IQR)	66.0 (57.0–77.0)	58.0 (53.0–74.0)	0.059	66.0 (57.0–77.0)	62.0 (53.0–76.0)	0.157
No. (%) of males	28 (60.9)	131 (67.5)	0.493	44 (56.4)	115 (71.0)	0.037
Charlson comorbidity index	2 (2–4)	2 (2–3)	0.767	2 (2–3)	2 (1–3)	0.776
No. hematological malignancy (%)	24 (52.2)	37 (19.1)	<0.001	29 (37.2)	32 (19.8)	0.006
No. severe neutropenia (%)	26 (56.5)	32 (16.5)	<0.001	33 (42.3)	25 (15.4)	<0.001
No. nosocomial acquisition (%)	34 (73.9)	101 (52.1)	0.012	59 (75.6)	76 (46.9)	<0.001
No. high-risk source (%)	44 (95.7)	103 (53.1)	<0.001	66 (84.6)	81 (50.0)	<0.001
No. respiratory (%)	29 (63.0)	24 (12.4)	<0.001	35 (44.9)	18 (11.1)	<0.001
No. Pitt bacteremia score ≥ 2 (%)	40 (86.9)	92 (47.4)	<0.001	62 (79.5)	70 (43.2)	<0.001
No. septic shock (%)	27 (58.7)	37 (19.1)	<0.001	35 (44.9)	29 (17.9)	<0.001
No. inadequate empiric antibiotic (%)	22 (47.8)	63 (32.5)	0.074	30 (38.5)	55 (33.9)	0.589
No. MDR phenotype (%)	31 (67.4)	61 (31.4)	<0.001	48 (61.5)	44 (27.2)	<0.001
No. VIM-2/ST175 (%)	13 (28.3)	29 (14.9)	0.055	20 (25.6)	22 (13.6)	0.034
No. GES-5/ST235 (%)	15 (32.6)	18 (9.3)	<0.001	23 (29.5)	10 (6.2)	<0.001
No. <i>exoU</i> +/ <i>exoS</i> - genotype (%)	19 (41.3)	30 (15.5)	<0.001	29 (37.2)	20 (12.3)	<0.001
No. O4 serotype (%)	14 (30.4)	35 (18.0)	0.095	21 (26.9)	28 (17.3)	0.118
No. O11 serotype (%)	18 (39.1)	19 (9.8)	<0.001	25 (32.1)	12 (7.4)	<0.001
Median TTP (hours) of blood culture (IQR) ^f	14.0 (11.0–16.0)	16.0 (12.0–19.0)	0.005	14.0 (11.0–17.0)	17.0 (13.0–19.0)	0.001

^aEarly nonsurvivors; *n* = 46, 19.2%.^bEarly survivors; *n* = 194, 80.8%.^cLate nonsurvivors; *n* = 78, 32.5%.^dLate survivors; *n* = 162, 67.5%.^eMDR, multidrug-resistant; ST, sequence type; TTP, time to positivity.^fTime from the start of incubation to the alert signal in the blood culture system.^gThree patients were excluded from analysis due to palliative treatment, thus the total was *n* = 240.

Accordingly, we found that the *exoU*-positive genotype and the O11 serotype were risk factors for mortality, independently of other variables, including multidrug resistance (Fig. 3). The TTSS genotype is considered one of the most important virulence determinants of *P. aeruginosa* (15, 23). Of the four TTSS effector proteins (ExoS, ExoT, ExoU, and ExoY), ExoU has been associated with poor outcomes in both clinical and experimental research (16–19). A recent experimental study showed that the *exoU* gene was expressed and ExoU was produced early during acute pneumonia in a mouse model. This exotoxin possesses phospholipase A₂ activity that causes rapid plasma membrane disruption and necrotic cell death. Therefore, it promotes bacterial transmigration by killing epithelial cells (17). In a Spanish multicenter study, Peña and colleagues elegantly showed the *exoU*-positive genotype to be an independent pre-

TABLE 4 Multivariate analysis of predictor factors for 5-day and 30-day crude mortality of patients with *P. aeruginosa* bloodstream infections.

Variable ^b	5-day mortality (early mortality) ^{a,c}						30-day mortality (late mortality) ^c					
	Model 1		Model 2		Model 3		Model 1		Model 2		Model 3	
	aOR (CI 95%)	P	aOR (CI 95%)	P	aOR (CI 95%)	P	aOR (CI 95%)	P	aOR (CI 95%)	P	aOR (CI 95%)	P
Severe neutropenia	9.47 (3.52–25.5)	<0.001	6.57 (2.62–16.5)	<0.001	9.21 (3.40–24.9)	<0.001	2.97 (1.38–6.35)	0.005	2.80 (1.32–5.92)	0.007	2.80 (1.32–5.92)	0.007
Respiratory infection	3.22 (2.02–5.14)	<0.001	2.94 (1.87–4.62)	<0.001	3.23 (2.01–5.16)	<0.001	1.93 (1.30–2.86)	0.001	1.95 (1.31–2.90)	0.001	1.95 (1.31–2.90)	0.001
Nosocomial acquisition	—	—	—	—	—	—	1.62 (1.10–2.37)	0.012	1.56 (1.07–2.27)	0.019	1.56 (1.07–2.27)	0.019
Pitt score ≥ 2	2.49 (1.39–4.44)	0.002	2.14 (1.23–3.71)	0.007	2.42 (1.34–4.36)	0.003	1.86 (1.28–2.70)	0.001	1.81 (1.25–2.63)	0.002	1.81 (1.25–2.63)	0.002
<i>exoU</i> +/ <i>exoS</i> - genotype	2.99 (1.06–8.42)	0.038	3.58 (1.31–9.79)	0.013	—	—	3.89 (1.65–9.19)	0.002	—	—	—	—
MDR phenotype	—	—	2.39 (0.97–5.87)	0.057	—	—	—	—	3.63 (1.42–9.31)	0.007	—	—
Inadequate empiric antibiotic	4.57 (1.59–13.1)	0.005	—	—	4.17 (1.42–12.2)	0.009	2.18 (1.04–4.58)	0.04	2.17 (1.03–4.58)	0.042	2.17 (1.03–4.58)	0.042
Median TTP (hours) of blood culture (IQR) ^d	0.88 (0.80–0.97)	0.009	0.90 (0.82–0.98)	0.014	0.88 (0.81–0.97)	0.01	0.91 (0.86–0.97)	0.005	0.92 (0.86–0.97)	0.008	0.92 (0.86–0.97)	0.008

^aaOR, adjusted odds ratio; CI, confidence interval.^bMDR, multidrug-resistant; TTP, time to positivity; —, variables included in the initial model of multivariate analysis, then discarded in a stepwise backward selection process.^cThree patients were excluded from analysis due to palliative treatment, thus the total was *n* = 240.^dTime from the start of incubation to the alert signal in the blood culture system.

Pathogen-Related Factors in *P. aeruginosa* BSI

Antimicrobial Agents and Chemotherapy

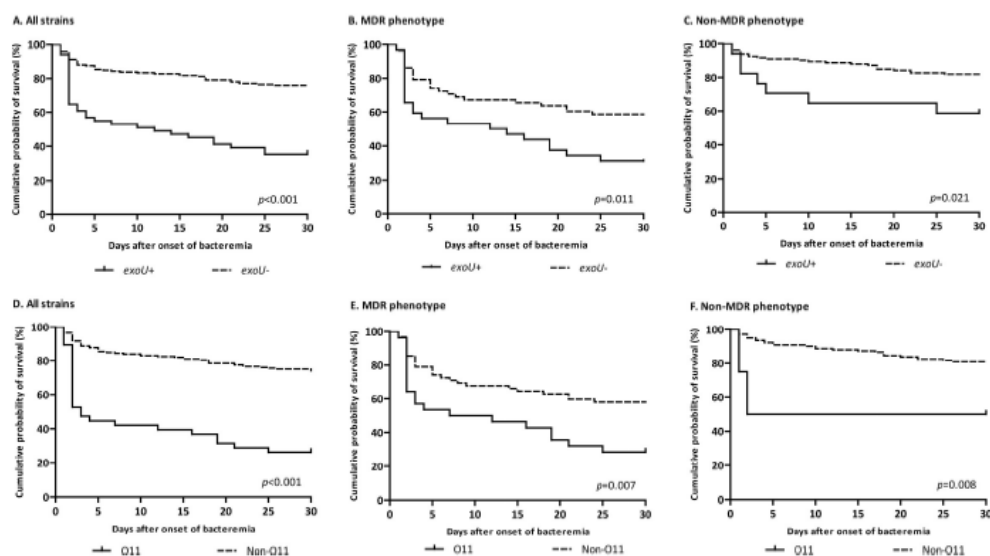


FIG 3 Kaplan-Meier curves showing the crude impact of *exoU* genotype (A, B, and C) and O11 serotype (D, E, and F) on 30-day mortality in patients with *P. aeruginosa* bloodstream infections according to the resistance phenotype. Statistical significance was determined by the log-rank test.

dictor of early mortality in *P. aeruginosa* BSI (18). Similarly, the O-antigen serotype has been used for the classification of *P. aeruginosa* isolates and plays an important immunogenic and structural role (20, 21, 24–26). Among *P. aeruginosa* isolates, O11 is one of the most prevalent serotypes worldwide and has been correlated with poorer prognosis in nosocomial pneumonia (20). In an experimental model of acute lung infection, serotype O11 was found to be associated with increased lung injury, probably related to the presence of ExoU (21). Unluckily, in our series most O11 serotype strains also carried the *exoU*-positive genotype, so it was difficult to distinguish whether this specific serotype behaved as a direct virulence factor or was only a surrogate marker of a hazardous isolate of *P. aeruginosa*. Therefore, definitive conclusions regarding the involvement of the O11 serotype in a poorer outcome should be taken with caution.

Thus, we were particularly interested in assessing the association between O serotypes, TTSS genotypes, and resistance phenotypes. In agreement with previous studies, we observed that O4 and O11 isolates exhibited mostly an MDR phenotype and an *exoS*-positive or *exoU*-positive genotype, respectively (24–26). Given this connection, the isolation of an O4 and/or O11 serotype *P. aeruginosa* is meaningful for the patient's prognosis and for the empirical antibiotic choice. In our setting, O-antigen serotyping could be a simple, useful procedure for the rapid presumptive identification of MDR/XDR isolates susceptible only to colistin, amikacin, and some of them to ceftazidime-avibactam (8, 9). On the other hand, the identification of serotypes other than O4 or O11 would significantly decrease the chances of an MDR isolate. While this association has been shown in our hospital, the coincidence of the O4 and O11 serotypes with ST175 and ST235 international high-risk clones could make these observations of interest in many other locations (19, 27, 28). In fact, in a recent Spanish nationwide study, including 1445 *P. aeruginosa* isolates, Del Barrio-Tofiño and colleagues found that O4 and O11 serotypes are linked to the MDR/XDR profile of widespread ST175 and ST235 clones, respectively (29).

The strength of our multivariate analysis is reinforced by its adjustment with other relevant variables also influencing a patient's prognosis. Severe neutropenia is a serious condition usually concurrent with underlying hematological diseases, which easily gives way to uncontrolled infection and death (30). The severity of the clinical presentation, especially in the setting of respiratory infection, has a well-documented impact on mortality (1, 2, 4, 5, 19). BSI nosocomially acquired was also an independent predictor of late mortality, and probably stands as a surrogate marker of a clinical patient's complexity. In addition, inadequate initial empirical therapy has also been associated with poor prognosis (2, 5, 6), likely reflecting the low number of valid options in the setting of multidrug resistance.

The odds-ratio coefficients were also adjusted by the time to positivity of blood cultures. Although there's potential for this to be influenced by the volume of blood inoculated in the bottles, or by an over-long delay in the sampling processing, the performance of blood cultures has become a standard, easy, and automatized procedure. From an overall perspective, the time to positivity stands as a surrogate marker of the inoculum, meaning that cases with a high bacterial burden will result in positive blood cultures sooner than infections of low inoculum. While our area under the receiver operating characteristic (ROC) curves were not good-enough to identify a precise time cutoff (not shown), Fig. S2 illustrates well the association of this variable with the likelihood of death, which has also been shown in other BSI (31).

Our study has the inherent limitations of a retrospective analysis. Although the confounding variables have been controlled for, they may be subject to the usual biases. Also, our study reflects the experience of just a single medical center and the results may not be applicable to other locations with a different epidemiology. In addition, we did not consider in our analysis the doses or optimized administration (e.g., extended-infusion) of antipseudomonal antibiotics. Despite this, our study provides some insights about the association between antimicrobial resistance and virulence traits, as well as the implications of host, pathogen, and antimicrobial treatment on patient's outcomes.

In conclusion, MDR *P. aeruginosa* BSI represents a serious infection, associated with significant crude mortality. Overall, many of our MDR cases illustrate that the coexistence of specific virulence traits along with the acquisition of resistance determinants implies a "perfect storm" infection and a poorer prognosis for the patient. In this context, O-antigen serotyping is a tool potentially capable of rapid identification of MDR/XDR and virulent strains, thus guiding the choices of antimicrobial therapy, including novel β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations, and supporting the close monitoring of patients.

MATERIALS AND METHODS

Study design. This retrospective observational cohort study was conducted at the Hospital Universitario 12 de Octubre, a 1300-bed tertiary-care teaching hospital, in Madrid, Spain. The study included all patients with laboratory-confirmed *P. aeruginosa* BSI from January 2013 to December 2017. Only the first episode of bacteremia recorded for each individual patient was included. Nonduplicated clinical isolates from *P. aeruginosa* BSI patients were collected. Patients less than 18 years of age, with polymicrobial bacteremia, or those with incomplete medical records were excluded.

Ethical approval. This study was approved by the Research Ethics Committee of our institution (Health Research Institute, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain) (reference number TP17/0041), which exempted the need to seek written informed consent due to the observational nature of the study. All the data collected were anonymized.

Clinical variables and definitions. Patient data were collected via chart review and included the following factors: (i) age; (ii) sex; (iii) comorbidities; (iv) severity of underlying diseases measured by the Charlson comorbidity index (32); (v) presence of severe neutropenia; (vi) antimicrobial treatment received in the previous month; (vii) prior known MDR *P. aeruginosa* colonization; (viii) intensive care admission in the previous 3 months; (ix) invasive procedures performed prior to the diagnosis of BSI (i.e., need for mechanical ventilation, use of venous catheter or urinary catheter); (x) surgery in the previous month; (xi) acquisition type (community, health care-associated, and nosocomial); (xii) ward of admission at the time of BSI (medical, onco-hematological, surgical, or intensive care); (xiii) source of bacteremia; (xiv) presentation with septic shock (33); (xv) Pitt bacteremia score (34); and (xvi) adequate empirical therapy. The main outcome variables were crude mortality at 5 days (early mortality) and 30 days (late mortality) after the onset of BSI.

Nosocomial bacteremia was defined as infection occurring more than 48 h after hospital admission. Healthcare-associated bacteremia was defined according to criteria previously described by Friedman et al. (35). Source of bacteremia was divided into 2 categories: (i) high-risk sources, which included the respiratory tract, intraabdominal, skin and soft tissues and those of unknown origin; and (ii) low-risk sources, which included urinary tract and vascular catheter (6). Septic shock was defined as sepsis associated with evidence of organ hypoperfusion and systolic blood pressure of <90 mm Hg or the need for vasopressors to maintain blood pressure (32). Severe neutropenia was defined as an absolute neutrophil count of <500 neutrophils/mm³. Adequate empirical antibiotic therapy was considered when at least 1 antipseudomonal antibiotic with *in vitro* activity was administered during the first 24 h after taking the blood sample. Crude mortality was defined as death by any cause.

Microbiological variables and molecular studies. Blood cultures were processed using the BacT/Alert 3D blood culture system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Time to positivity, defined as the period between the start of incubation in the blood culture instrument and the automated growth signal, was documented by the system software and recorded automatically for each positive blood culture. Identification was carried out using MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker Daltonics Inc., Bremen, Germany). Antimicrobial susceptibility testing was performed using a semiautomated microdilution system (MicroScan, Beckman Coulter diagnostics, Indianapolis, US), including the following antimicrobial agents: ceftazidime, cefepime, aztreonam, piperacillin-tazobactam, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramycin, amikacin, ciprofloxacin, and colistin. MICs of ceftolozane-tazobactam and ceftazidime-avibactam were also determined by Etest (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Breakpoints were in accordance with the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) v.8.1 (www.eucast.org).

MDR *P. aeruginosa* isolates were defined as strains nonsusceptible to at least 1 agent in 3 or more antipseudomonal antimicrobial categories. XDR isolates were defined as nonsusceptible to at least 1 agent in all but 2 or fewer antipseudomonal antimicrobial categories; thus, an XDR isolate was also included as MDR (36). All other *P. aeruginosa* isolates were considered non-MDR strains, and this category included moderately resistant (nonsusceptible to ≥ 1 agent in <3 antimicrobial categories) and multidrug-susceptible (susceptible to all antimicrobial agents) strains (18).

The detection of carbapenemase genes (*bla_{GES}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, and *bla_{NDM}*) was investigated by PCR and sequencing. Clonal relatedness among XDR isolates was first evaluated by pulsed-field gel electrophoresis (37). One representative XDR isolate was further analyzed by multilocus sequence typing (38) using an available database (<https://pubmlst.org/paeruginosa/>). The detection of *exoS*, *exoT*, *exoU*, and *exoY* genes was performed by PCR and sequencing as described previously (23). The O serotype was determined by agglutination using monovalent antiserum (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) to 16 somatic O-antigens as described previously (20). Nontypeable strains did not agglutinate with any antisera.

Statistical analysis. The results were expressed as medians and interquartile ranges (IQR) for continuous variables or as absolute and relative frequencies for categorical variables. Continuous and categorical parameters were compared using the Student's *t* test or the Mann-Whitney *U* test, and the χ^2 test or Fisher's exact test, respectively. Linear trends were assessed by the Mantle-Haenszel test. Independent risk factors of mortality were identified using a logistic regression model, including variables with *P* values of ≤ 0.1 in the univariate analysis. Given the high number of potential predictors of mortality, a backward stepwise algorithm was used to identify the best-fitting subset of variables for use in the final multivariate regression model. The likelihood ratio criteria were used for choosing the best model. Absence of collinearity among variables included in the initial model was verified. Kaplan-Meier survival curves were used for survival analysis, and the log-rank test was used to compare differences between groups. Patients who were discarded for active antimicrobial therapy due to end-stage disease were considered not evaluable for the analysis of crude mortality. All statistical tests were two-tailed and a *P* value of ≤ 0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed using the SPSS statistical package v.20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and graphics were generated with Prism software v.5.0 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.4 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mar Aguilera, Antonia Martín, and Esther Zabala (Department of Clinical Microbiology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain) for technical assistance.

This study was supported by Plan Nacional de I+D+ i 2013 to 2016, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016), and cofinanced by the European Development Regional Fund via "A way to achieve Europe." E. V. was also supported by a "Juan Rodés" fellowship grant (Instituto de Salud Carlos III).

We declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Peña C, Suarez C, Gozalo M, Murillas J, Almirante B, Pomar V, Aguilar M, Granados A, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Rodríguez F, Tubau F, Martínez-Martínez L, Oliver A. 2012. Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 56:1265–1272. <https://doi.org/10.1128/AAC.05991-11>.
- Peña C, Suarez C, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, Aguilar M, Granados A, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Rodríguez F, Tubau F, Oliver A, Martínez-Martínez L. 2013. Effect of adequate single-drug vs combination antimicrobial therapy on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: a post hoc analysis of a prospective cohort. *Clin Infect Dis* 57:208–216. <https://doi.org/10.1093/cid/cit223>.
- Tam VH, Rogers CA, Chang KT, Weston JS, Caeiro JP, Garey KW. 2010. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia on patient outcomes. *Antimicrob Agents Chemother* 54:3717–3722. <https://doi.org/10.1128/AAC.00207-10>.
- Joo E-J, Kang C-I, Ha YE, Kang S-J, Park SY, Chung DR, Peck KR, Lee NY, Song J-H. 2011. Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: clinical impact of antimicrobial resistance on outcome. *Microb Drug Resist* 17:305–312. <https://doi.org/10.1089/mdr.2010.0170>.
- Kang C-I, Kim S-H, Kim H-B, Park S-W, Choe Y-J, Oh M-D, Kim E-C, Choe K-W. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin Infect Dis* 37:745–751. <https://doi.org/10.1086/377200>.
- Kang C, Kim S, Park WB, Kim H, Kim E, Oh M, Choe K, Lee K. 2005. Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant Gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 49:760–766. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.760-766.2005>.
- Beceiro A, Tomas M, Bou G. 2013. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev* 26:185–230. <https://doi.org/10.1128/CMR.00059-12>.
- Del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Cabot G, Rivera A, Benito N, Segura C, Montero MM, Sorli L, Tubau F, Gómez-Zorrilla S, Tormo N, Durá-Navarro R, Viedma E, Resino-Foz E, Fernández-Martínez M, González-Rico C, Alejo-Cancho I, Martínez JA, Labayru-Echverría C, Dueñas C, Ayestarán I, Zamorano L, Martínez-Martínez L, Horcajada JP, Oliver A. 2017. Genomics and susceptibility profiles of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e01589-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01589-17>.
- del Barrio-Tofiño E, Zamorano L, Cortes-Lara S, López-Causapé C, Sánchez-Diener I, Cabot G, Bou G, Martínez-Martínez L, Oliver A, Galán F, Gracia I, Rodríguez MA, Martín L, Sánchez JM, Viñuela L, García MV, Lepe JA, Aznar J, López-Hernández I, Seral C, Javier Castillo-García F, López-Calleja AI, Spiroz C, de la Iglesia P, Ramón S, Riera E, Cruz Pérez M, Gallegos C, Calvo J, Dolores Quesada M, Marco F, Hoyos Y, Pablo Horcajada J, Larrosa N, González JJ, Tubau F, Capilla S, Pérez-Moreno MO, Centelles MJ, Padilla E, Rivera A, Mirelis B, Elisa Rodríguez-Tarazona R, Arenal-Andrés N, del Pilar Ortega M, Megías G, García I, Colmenarejo C, González JC, Martínez NM, Gomila B, Giner S, Tormo N, Garduño E, Agulla JA, Seoane A, Pita J, Vidal IP, Guzmán DM, García M, Pérez del Molino ML, Barbeito G, Artiles F, Azcona-Gutiérrez JM, Sáenz Y, Antonio Oteo J, González A, Villa J, Chaves F, Cercenado E, Alarcón T, Zurita ND, Merino I, Morosini MI, Cantón R, Isabel Sánchez M, Moreno L, Yagüe G, Leiva J, Luis Barrios J, Canut A, Oteo J. 2019. Spanish nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance mechanisms and epidemiology. *J Antimicrob Chemother* 74:1825–1835. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz147>.
- Potron A, Poirel L, Nordmann P. 2015. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 45:568–585. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>.
- Woodford N, Turtton JF, Livermore DM. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35:736–755. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>.
- Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. 2015. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat* 21:41–59. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2015.08.002>.
- Geisinger E, Isberg RR. 2017. Interplay between antibiotic resistance and virulence during disease promoted by multidrug-resistant bacteria. *J Infect Dis* 215:59–17. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw402>.
- Juan C, Peña C, Oliver A. 2017. Host and pathogen biomarkers for severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 215:544–551. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw299>.
- Hauser AR. 2009. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 7:654–665. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>.
- El-Solh AA, Hattemer A, Hauser AR, Alhajhusain A, Vora H. 2012. Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Crit Care Med* 40:1157–1163. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182377906>.
- Howell HA, Logan LK, Hauser AR. 2013. Type III secretion of ExoU is critical during early *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *mBio* 4:e00032. <https://doi.org/10.1128/mBio.00032-13>.
- Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, Aguilar M, Granados A, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Rodríguez-López F, Tubau F, Martínez-Martínez L, Oliver A. 2015. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 60:539–548. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu866>.
- Recio R, Villa J, Viedma E, Orellana MA, Lora-Tamayo J, Chaves F. 2018. Bacteraemia due to extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 high-risk clone: facing the perfect storm. *Int J Antimicrob Agents* 52:172–179. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.018>.
- Lu Q, Eggimann P, Luyt C-E, Wolff M, Tamm M, François B, Mercier E, Garbino J, Laterre P-F, Koch H, Gafner V, Rudolf MP, Mus E, Perez A, Lazar H, Chastre J, Rouby J-J. 2014. *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. *Crit Care* 18:R17. <https://doi.org/10.1186/cc13697>.
- Le Berre R, Nguyen S, Nowak E, Kipnis E, Pierre M, Quenee L, Ader F, Lancel S, Courcol R, Guery BP, Faure K. 2011. Relative contribution of three main virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Crit Care Med* 39:2113–2120. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31821e899f>.
- Thaden JT, Park LP, Maskarinec SA, Ruffin F, Fowler VG, van Duin D. 2017. Results from a 13-year prospective cohort study show increased mortality caused by *Pseudomonas aeruginosa* compared to other bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02671-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02671-16>.
- Feltman H, Jain M, Peterson L, Schuler G, Khan S, Hauser AR. 2001. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 147:2659–2669. <https://doi.org/10.1099/0022271-147-10-2659>.
- Faure K, Shimabukuro D, Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, Wiener-Kronish JP. 2003. O-antigen serotypes and type III secretory toxins in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 41:2158–2160. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.5.2158-2160.2003>.
- Jamasbi RJ, Proudfoot EM. 2008. Phenotypic and genotypic characteristics of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: rate of occurrence and distribution of different serotypes, antimicrobial susceptibility profiles, and molecular typing. *Lab Med* 39:155–161. <https://doi.org/10.1309/1BAWW0951N7V71CE>.
- Berthelot P, Attree I, Plésiat P, Chabert J, de Bentzmann S, Pozzetto B, Grattard F. 2003. Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and exo genes. *J Infect Dis* 188:512–518. <https://doi.org/10.1086/377000>.
- Viedma E, Juan C, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F, Chaves F, Oliver A. 2009. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum β -lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 53:4930–4933. <https://doi.org/10.1128/AAC.00900-09>.
- Viedma E, Juan C, Villa J, Barrado L, Ángeles Orellana M, Sanz F, Otero JR, Oliver A, Chaves F. 2012. VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone, Spain. *Emerg Infect Dis* 18:1235–1241. <https://doi.org/10.3201/eid1808.111234>.
- del Barrio-Tofiño E, Sánchez-Diener I, Zamorano L, Cortes-Lara S, López-Causapé C, Cabot G, Bou G, Martínez-Martínez L, Oliver A, Galán F, Gracia I, Rodríguez MA, Martín L, Sánchez JM, Viñuela L, García MV, Lepe JA,

- Aznar J, López-Hernández I, Seral C, Castillo-García FJ, López-Calleja AI, Aspiroz C, de la Iglesia P, Ramón S, Riera E, Pérez MC, Gallegos C, Calvo J, Quesada MD, Marco F, Hoyos Y, Horcajada JP, Larrosa N, González JJ, Tubau F, Capilla S, Pérez-Moreno MO, Centelles MJ, Padilla E, Rivera A, Mirelis B, Rodríguez-Tarazona RE, Arenal-Andrés N, del Pilar Ortega M, Megías G, García I, Colmenarejo C, González JC, Martínez NM, Gomila B, Giner S, Tormo N, Garduño E, Agulla JA, Seoane A, Pita J, Vidal IP, Guzmán DM, García M, Pérez del Molino ML, Barbeito G, Artiles F, Azcona-Gutiérrez JM, Sáenz Y, Oteo JA, González A, Villa J, Chaves F, Cercenado E, Alarcón T, Zurita ND, Merino I, Morosini MI, Cantón R, Sánchez MI, Moreno L, Yagüe G, Leiva J, Barrios JL, Canut A, Oteo J. 2019. Association between *Pseudomonas aeruginosa* O-antigen serotypes, resistance profiles and high-risk clones: results from a Spanish nationwide survey. *J Antimicrob Chemother* 74:3217–3220. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz346>.
30. Marin M, Gudiol C, Ardanuy C, García-Vidal C, Calvo M, Arnan M, Carratalá J. 2014. Bloodstream infections in neutropenic patients with cancer: differences between patients with haematological malignancies and solid tumours. *J Infect* 69:417–423. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.05.018>.
31. Liao CH, Lai CC, Hsu MS, Huang YT, Chu FY, Hsu HS, Hsueh PR. 2009. Correlation between time to positivity of blood cultures with clinical presentation and outcomes in patients with *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia: prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect* 15: 1119–1125. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02720.x>.
32. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. 1987. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 40:373–383. [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(87\)90171-8](https://doi.org/10.1016/0021-9681(87)90171-8).
33. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Cooper-Smith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, Poll T, Der, Vincent JL, Angus DC. 2016. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA* 315:801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>.
34. Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, Quinn JP, Hooper DC, Johnson MP, Ramphal R, Wagener MM, Miyashiro DK, Yu VL. 1991. Enterobacter bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann Intern Med* 115:585. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-115-8-585>.
35. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, Lamm W, Clark C, Macfarquhar J, Walton AL, Reller LB, Sexton DJ. 2002. Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med* 136:791–798. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-137-10-200211190-00007>.
36. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18:268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
37. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen Pa, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233–2239.
38. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 42:5644–5649. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004>.



Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia isolates in a high-endemicity setting for ST175 and ST235 high-risk clones

Raúl Recio¹ · Irina Sánchez-Diener² · Esther Viedma¹ · María Ángeles Meléndez-Carmona¹ · Jennifer Villa¹ · María Ángeles Orellana¹ · Mikel Mancheño³ · Carlos Juan² · Laura Zamorano² · Jaime Lora-Tamayo³ · Fernando Chaves¹ · Antonio Oliver²

Received: 20 August 2019 / Accepted: 27 November 2019 / Published online: 10 December 2019
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* represents a major clinical concern. The interplay between antimicrobial resistance and virulence of *P. aeruginosa* was investigated in vitro and in vivo studies. Thirty-eight well-characterized (21 MDR and 17 non-MDR) *P. aeruginosa* strains from patients with bacteraemia were analysed. Resistance phenotype, carbapenemase production, clonal relatedness, type III secretion system genotype, O-antigen serotype, cytotoxicity (ability to lyse cells) on A549 cells, and virulence (lethality in nematodes) in a *Caenorhabditis elegans* model were investigated. MDR strains showed lower cytotoxicity ($35.4 \pm 21.30\%$ vs. $45.0 \pm 18.78\%$; $P = 0.044$) and virulence (66.7% vs. 100% ; $P = 0.011$) than non-MDR strains. However, the pathogenicity of MDR high-risk clones varied broadly, with ST235 and ST175 clones being the most and least cytotoxic ($51.8 \pm 10.59\%$ vs. $11.0 \pm 1.25\%$; $P < 0.0001$) and virulent (100% vs. 73.1 ; $P = 0.075$) and $[0\%$ vs. 93.9% ; $P < 0.0001$], respectively). The pathogenicity of the ST235 clone was similar to that of non-MDR strains, and its ability to lyse cells and high virulence were related with the *exoU*-positive genotype. Furthermore, the O11 serotype was more frequent among the ST235 clone and *exoU*-positive genotype strains and was also essential for the pathogenicity of *P. aeruginosa*. Our data suggest that the pathogenicity of MDR high-risk clones is the result not only of the resistance phenotype but also of the virulence genotype. These findings have implications for the clinical management of patients and infection control programmes.

Keywords *Pseudomonas aeruginosa* · Antimicrobial resistance · High-risk clones · Virulence · Experimental models

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is one of the most common and serious causes of healthcare-associated bacteraemia [1, 2]. Although the reasons for the high mortality associated with this infection are multifactorial (e.g. host, pathogen and treatment), the genetic and phenotypic characteristics of *P. aeruginosa* (e.g. antibiotic resistance and virulence traits) are likely to play a major role [3–7]. Nevertheless, the impact of these pathogen-related factors on the pathogenicity of *P. aeruginosa* bacteraemia isolates is not clearly established.

The emergence and dissemination of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) *P. aeruginosa* represent a major clinical concern [8–10]. These MDR/XDR strains have a clonal epidemic population structure made up of a limited number of widespread clones (ST111, ST175 and ST235). ST235 is the most prevalent of these high-risk clones [11–14]. *P. aeruginosa* also employs lipopolysaccharide and

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10096-019-03780-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Raúl Recio
raul.recio@salud.madrid.org

¹ Department of Clinical Microbiology, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i + 12), Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

² Department of Clinical Microbiology, Instituto de Investigación Sanitaria Islas Baleares (IdISBa), Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca, Spain

³ Department of Internal Medicine, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i + 12), Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

type III secretion system (TTSS) during acute infections, exerting direct toxic effects. The TTSS is a complex nanomachine that injects effector toxins (ExoU, ExoS, ExoT and ExoY) directly into host cells [15]. ExoU, which is frequently detected among ST235 high-risk clone and O11 serotype strains, displays a highly virulent phenotype and poor prognosis in patients with pneumonia and bacteraemia [16–19]. It is presumed that antimicrobial resistance frequently incurs a fitness cost that reduces virulence and hence disease severity [20, 21]. Nevertheless, this effect may vary depending on the specific genetic context of the strains [22, 23].

Given this background, the impact of multidrug resistance, and particularly high-risk clones, on the pathogenicity of *P. aeruginosa* isolates needs to be addressed. In a recent clinical study, we found that patients with *P. aeruginosa* bacteraemia caused by MDR isolates belonging to GES-5 ST235 clone and the *exoU*-positive genotype had a more severe clinical presentation and a poorer prognosis [19]. Since it is difficult to assess the possible deleterious effect of multidrug resistance through clinical research, experimental models are required. Therefore, in this study we investigated the interplay between antimicrobial resistance and virulence, with emphasis on the pathogenicity of MDR ST175 and ST235 high-risk clones, by testing a collection of well-characterized *P. aeruginosa* strains recovered from blood cultures in vitro and in vivo studies.

Methods

Bacterial strains and definition of resistance phenotypes

Thirty-eight nonduplicate *P. aeruginosa* clinical isolates from blood cultures were studied in vitro and in vivo models. They had been recovered from a recent clinical study of 64 *P. aeruginosa* isolates from patients with bacteraemia at the Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, Spain) [19, 24]. The 38 selected strains were considered to provide a representative profile of resistance phenotypes and the most common high-risk clones (VIM-2 ST175 and GES-5 ST235) in our setting. The main characteristics of the *P. aeruginosa* strains used in this study are shown in Table S1. *P. aeruginosa* strain PAO1 (*exoU*-/*exoS*+, non-cytotoxic strain) and strain PA14 (*exoU*+/*exoS*-, cytotoxic strain) were included as reference strains [20].

MDR isolates were defined as strains non-susceptible to at least one agent in three or more antipseudomonal antimicrobial categories. XDR strains were defined as strains non-susceptible to at least one agent in all but two or fewer antipseudomonal antimicrobial categories; thus, an XDR strain was also included in the MDR phenotype [25]. All other *P. aeruginosa* isolates were considered to be non-MDR strains

and included moderately resistant (ModR, non-susceptible to ≥ 1 agent in < 3 antimicrobial categories) and multidrug-susceptible (MultiS, susceptible to all antimicrobial agents) strains [18].

Antimicrobial susceptibility testing and molecular typing

Minimum inhibitory concentrations (MICs) of ceftazidime, ceftipime, aztreonam, piperacillin-tazobactam, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramycin, amikacin, ciprofloxacin, and colistin were determined by broth microdilution (Beckman Coulter, Indianapolis, USA), following EUCAST guidelines and breakpoints, Version 8.1. (www.eucast.org) [26].

Production of carbapenemases (GES, VIM and IMP) was investigated by PCR and sequencing. Clonal relatedness was established by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), as described previously [27]. All isolates were characterized by multilocus sequence typing (MLST) using the seven standard housekeeping genes (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* and *trpE*) in accordance with published protocols [28] and the available database (<http://pubmlst.org/paeruginosa>).

TTSS genotyping

PCR assays were performed for detection of *exoS*, *exoT*, *exoU* and *exoY* genes, as described previously [29] with slight modifications. PCR amplifications were performed under the following conditions: 1 cycle at 94 °C for 12 minutes, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 seconds, 58 °C for 30 seconds and 72 °C for 30 seconds and a final extension step at 72 °C for 10 minutes. The resulting PCR products were sequenced using BigDye® 3.1 technology (Applied Biosystems, Austin, TX).

O-antigen serotyping

O-antigen serotypes (O1 to O16) were determined by agglutination using commercially available serotype-specific monovalent antiserum (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), as described previously [30]. Nontypeable strains did not agglutinate in any antisera.

Cytotoxicity assay on A549 epithelial cells

The cytotoxicity assay was performed as described previously [31] on A549 cells, a human type II alveolar epithelial cell line. After 3 hours of incubation, cytotoxicity for A549 cells was measured by quantifying the release of lactate dehydrogenase (LDH) into the culture supernatant with the Cytotoxicity Detection Kit Plus LDH (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Assays were carried out in triplicate with three independent experiments for each strain. The percentage of cell lysis was calculated relative to the

maximum LDH release control value (cells lysed with a 1% solution of Triton X-100) following the manufacturer's instructions.

Caenorhabditis elegans killing assay

The nematode *Caenorhabditis elegans* was used as infection model, following the previously described protocol [32]. To establish a comprehensive comparative analysis of the lethality of the isolates tested, a *C. elegans* virulence score (CEVS) was applied. Strains were classified into five virulence levels depending on the effect on nematode growth: CEVS 1 (> 50 live nematodes at 168 hours) and 2 (> 5–50 live nematodes at 168 hours) were considered non-virulent, and CEVS 3 (1–5 live nematodes at 168 hours), 4 (≤ 1 live nematode at 168 hours) and 5 (0 live nematodes at 72 hours) were considered virulent. At least three independent replicate experiments per bacterial strain were performed. The *Escherichia coli* OP50 strain served as a non-pathogenic control.

Statistical analysis

Continuous and categorical variables were compared using the Student's *t*-test or the Mann-Whitney *U* test and the χ^2 test or Fisher's exact test, respectively. All statistical tests were two-tailed, and a *P* value of ≤ 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses and graphical representations were performed using the SPSS statistical package, Version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) and GraphPad Prism software, Version 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA).

Results

Resistance phenotypes and epidemic high-risk clones

The MDR phenotype was documented in 21 (55.3%) isolates (20 [95.2%] were XDR and only 1 [4.8%] was MDR non-XDR). The non-MDR phenotype was documented in 17 (44.7%) isolates (11 [64.7%] were ModR and 6 [35.3%] were considered to be MultiS). Among the MDR strains, the most commonly identified carbapenemase was GES-5 (12 [57.1%]), followed by VIM-2 (5 strains [23.8%]). PFGE revealed a clonal population structure among MDR strains (six different PFGE patterns: A [*n* = 12], B [*n* = 5], C [*n* = 1], D [*n* = 1], E [*n* = 1] and F [*n* = 1]). In contrast, non-MDR strains were represented by numerous genotypes with higher clonal diversity (Table S1). MLST analysis showed that the majority of the MDR strains belonged to international high-risk clones, including ST235 (12 [57.1%], PFGE pattern A) and ST175 (5 [23.8%], PFGE pattern B). In summary, GES-5 producing isolates belonged to PFGE pattern A (ST235), whereas VIM-2-producers belonged to PFGE pattern B (ST175).

ST235 high-risk clone was positive for the *exoU* genotype

The presence of *exoT* and *exoY* genes was documented in most strains (37 [97.4%] and 35 [92.1%], respectively). Concomitantly, all strains were positive for either *exoU* or *exoS* genes (21 [55.3%] and 13 [34.2%], respectively), except for four (10.5%) strains that were negative for both genes. The *exoU*-positive genotype was found in 12 (57.1%) MDR strains and 9 (52.9%) non-MDR strains. The *exoS*-positive genotype was found in nine (42.9%) MDR strains and four (23.5%) non-MDR strains. All ST175 strains showed the *exoS*-positive genotype, and all ST235 strains showed the *exoU*-positive genotype (Table S1).

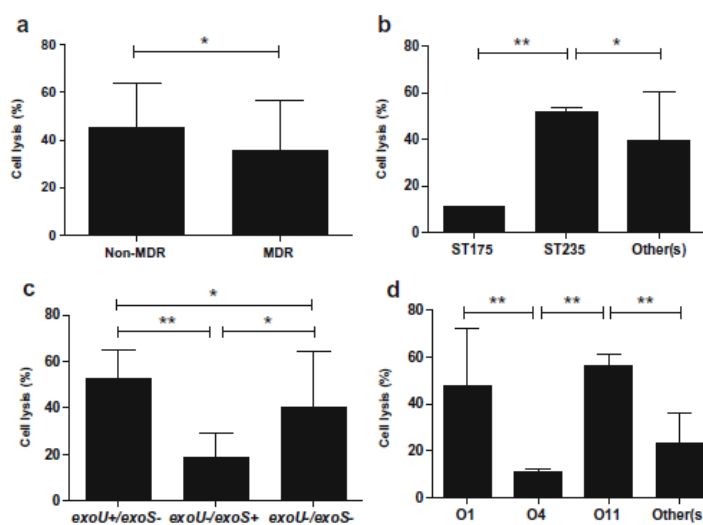
ST235 high-risk clone was positive for O11 and O1 serotypes

The O-antigen serotype was documented in most strains (37 [97.4%]), and only one strain (2.6%) was nontypeable. The most prevalent serotype was O11 (14 [36.8%]). In addition, 18.4% and 13.2% of the strains were found to be serotypes O1 and O4, respectively. Serotypes O4 and O11 were more frequently found in the MDR phenotype (5 [23.8%] and 10 [47.6%], respectively) and were present in all ST175 (5 [100%], O4) strains and most of the ST235 (10 [83.3%], O11) strains, respectively. The remaining two (16.7%) ST235 strains were serotyped as O1 isolates. The *exoU*-positive strains were frequently serotyped as O11 (14 [66.7%]) and O1 (4 [19%]). In contrast, the *exoS*-positive strains were frequently serotyped as O4 (5 [38.5%]) and O6 (3 [23.1%]) (Table S1).

ST235 high-risk clone showed the highest cytotoxicity to epithelial cells

The cytotoxicity results obtained for individual strains are shown in Table S1 and Fig. S1. The *in vitro* ability to lyse alveolar epithelial cells differed markedly among clinical strains depending on resistance phenotype, clonality, TTSS-genotype and O serotype (Fig. 1). Overall, non-MDR strains were significantly more cytotoxic than MDR strains ($45.0 \pm 18.78\%$ vs. $35.4 \pm 21.30\%$; $P = 0.044$) (Fig. 1A). However, a diverse pattern was observed among the various MDR/XDR high-risk clones for ability to lyse epithelial cells, with ST235 showing the highest cytotoxicity and ST175 the lowest ($51.8 \pm 10.59\%$ vs. $11.0 \pm 1.25\%$; $P < 0.0001$) (Fig. 1B). Furthermore, the *exoU*-positive strains were significantly more cytotoxic than the *exoS*-positive isolates ($52.7 \pm 12.22\%$ vs. $18.5 \pm 10.76\%$; $P < 0.0001$) (Fig. 1C). As shown in Figs. S2 and S3, the cytotoxicity of ST235 and *exoU*-positive strains was more similar to reference strain PA14, whereas the cytotoxicity of ST175 and *exoS*-positive strains was

Fig. 1 A549 cytotoxicity results after 3 hours of infection (MOI = 100) according to resistance phenotype (A), MLST genotype (B), TTSS genotype (C) and O serotype (D). Values are means \pm SD for at least three wells from three independent plates. The values that are significantly different are indicated by bars and asterisks as follows: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.0001$



more similar to reference strain PAO1. Among the most frequent O serotypes, O11 showed the highest cytotoxicity and O4 the lowest ($56.0 \pm 5.39\%$ vs. $11.0 \pm 1.25\%$; $P < 0.0001$) (Fig. 1D).

Increased virulence of ST235 high-risk clone in *C. elegans* model

The results obtained for individual strains in the virulence assay are shown in Table S1. The clinical strains in the *in vivo C. elegans* model showed differences in virulence according to resistance phenotype, clonality, TTSS genotype and O serotype (Fig. 2). Of the 38 strains studied, 31 (81.6%) were virulent (CEVS 3–5) and 7 (18.4%) were non-virulent (CEVS 1–2). However, the proportion of non-virulent strains increased markedly according to resistance phenotype, with non-MDR strains in fact being significantly more virulent than MDR strains (17/17 [100%] vs. 14/21 [66.7%]; $P = 0.011$) (Fig. 2A). Nevertheless, the pathogenicity of strains differed according to specific MDR/XDR high-risk clones. Notably, all isolates belonging to the ST235 clone showed a trend towards higher virulence (12/12 [100%] vs. 19/26 [73.1%]; $P = 0.075$), whereas ST175 strains showed the lowest virulence (0/5 [0%] vs. 31/33 [93.9%]; $P < 0.0001$) (Fig. 2B). Furthermore, *exoU*-positive strains were found to be more virulent than *exoS*-positive strains (21/21 [100%] vs. 6/13 [46.2%]; $P = 0.0003$) (Fig. 2C). Because *exoT* and *exoY*-genotypes were almost universally positive, these genes were not included in the analysis of virulence. Figure 3 illustrates

the higher virulence of ST235 (A) and *exoU*-positive strains (C) in the dynamics of *C. elegans* over time. Among the most frequent O serotypes, O11 showed the highest virulence (14/14 [100%] vs. 17/24 [70.8%]; $P = 0.033$) and O4 the lowest (0/5 [0%] vs. 31/33 [93.9%]; $P < 0.0001$) (Fig. 2D).

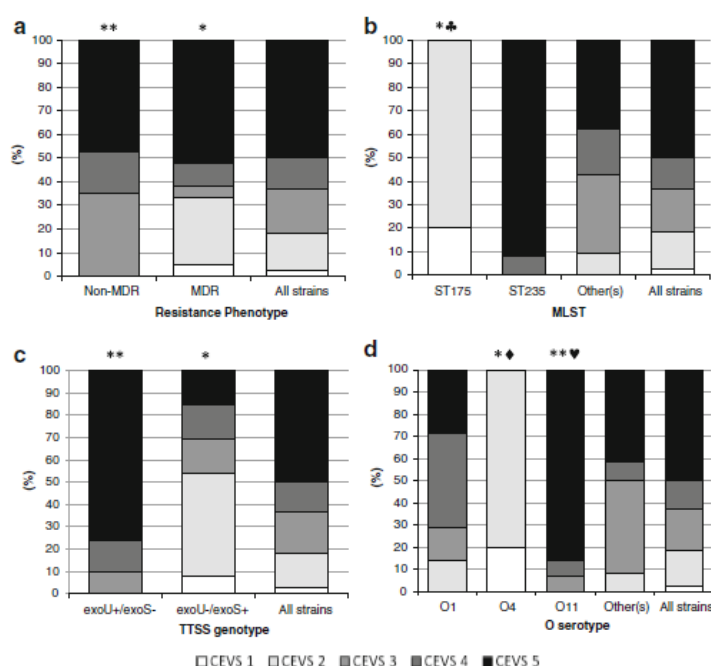
Correlation between *in vitro* and *in vivo* models

In order to determine the correlation between *in vitro* and *in vivo* assays, the variables were analysed according to their lethality in the *C. elegans* infection model. Table 1 shows that virulence (CEVS 3–5) or non-virulence (CEVS 1–2) was significantly associated with non-MDR and MDR phenotypes, *exoU* and *exoS*-positive genotypes, O11 and O4 serotypes and the ST175 high-risk clone. With respect to cytotoxicity, virulent strains were significantly more cytotoxic than non-virulent strains ($11.5 \pm 2.31\%$ vs. $46.1 \pm 17.28\%$; $P < 0.0001$).

Discussion

In this study, we documented a correlation between antibiotic resistance and the virulence of *P. aeruginosa* in experimental models, which is consistent with previous studies [20, 21, 31, 32]. We used different *in vitro* and *in vivo* assays to show that *P. aeruginosa* isolates belonging to the ST235 clone have a marked effect on pathogenicity in terms of their ability to lyse epithelial cells and their virulence in the *C. elegans* model. The probable explanation is that the higher virulence of

Fig. 2 Impact on *C. elegans* virulence score (CEVS) of resistance phenotype (A), MLST genotype (B), TTSS genotype (C) and O serotype (D). Non-virulent strains (CEVS 1–2) are shown in white and light grey tones, and virulent strains (CEVS 3–5) are shown in black and dark grey tones. The values that are significantly different are indicated by asterisks as follows: *, lower virulence ($P \leq 0.05$); **, higher virulence ($P \leq 0.05$); ♦, comparison between ST175 and non-ST175 strains; ♦♦, comparison between O4 and non-O4 strains; and ♥, comparison between O11 and non-O11 strains



ST235 strains relies mainly on their potent cytotoxicity, related to the *exoU*-positive genotype [11, 14, 18, 19]. In other words, our data suggest that the presence of ExoU could be decisively implicated in the higher virulence of the ST235 strains studied.

Our results showed that non-MDR (MultiS and ModR) strains were associated with greater cytotoxicity and higher virulence than MDR (MDR non-XDR and MDR-XDR) strains. These findings are consistent with previous reports suggesting that the acquisition of resistance mechanism is associated with fitness cost and decreased virulence [20, 21, 31–33]. This study however provides evidence that the pathogenicity of *P. aeruginosa* strains varies among strains with the MDR phenotype. In fact, in a recent study performed by our group involving 64 episodes of bacteraemia, we demonstrated that 30-day all-cause mortality was higher in patients with MDR-XDR strains belonging to the ST235 clone than in those produced by ST175, both of which are responsible for the high-endemicity setting in our hospital [19, 24, 34, 35].

Here, we observed that the pathogenicity of the ST235 strains was similar to that of non-MDR strains in terms of both their ability to lyse epithelial cells and their lethality in the *C. elegans* model, despite the fact that they exhibited a wide

array of acquired resistance mechanisms [11, 14, 36]. In contrast, the ST175 strains were associated with particularly low virulence. These results support a previous study suggesting that epidemic high-risk clones are characterized by a defined set of biological markers that include reduced bacterial motility and pigment production [13].

In this respect, we found that *exoU*-positive genotype was associated with high levels of cytotoxicity and increased virulence in the *C. elegans* model. These findings agree with previous reports demonstrating that TTSS genotype, in particular the *exoU* gene, is one of the most important virulence determinants of *P. aeruginosa* and is associated with an increased risk of mortality in clinical studies [17–19]. ExoU is a phospholipase that induces plasma membrane disruption and necrotic cell death. A recent experimental study in a mouse model showed that the *exoU* gene was expressed and ExoU was produced early during acute lung infection [37]. Of the high-risk clones, only ST235 was *exoU*-positive, explaining the virulence of these strains.

We also observed that strains serotyped as O11 showed a greater ability to lyse epithelial cells and increased virulence in the *C. elegans* model. The virulence of O11 serotype strains may be related to the presence of the *exoU*-positive genotype.

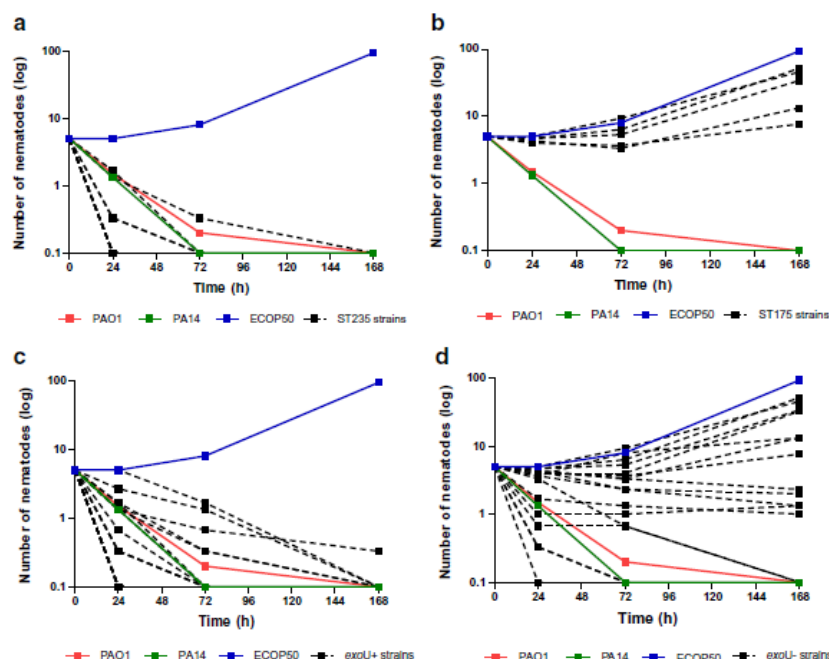


Fig. 3 Lethality of *P. aeruginosa* of ST235 and ST175 (panel A and B) high-risk clones and *exoU*⁺ and *exoU*⁻ genotypes (panel C and D) in *C. elegans* model. The mean number of surviving nematodes at 0, 24, 72 and 168 hours are shown. PAO1 strain (continuous red line) and PA14 strain (continuous green line) values were included for comparative purposes. The *Escherichia coli* strain OP50 (continuous blue line), used to feed the nematodes, was used as a non-pathogenic control

In previous studies, it was found that strains secreting ExoU were frequently serotyped as O11 [16, 38]. Hence, the monitoring of O serotypes and the *exoU*-genotype has epidemiological significance for the identification of virulent *P. aeruginosa* isolates. Remarkably, analysis of O serotypes indicates that there may be distinct clades of ST235 clone in our hospital (O1 and O11 serotypes).

In this study, we also investigated the potential association between *in vitro* and *in vivo* studies. Interestingly, we found that virulence (CEVS 3–5) or non-virulence (CEVS 1–2) of the *P. aeruginosa* strains was significantly correlated with non-MDR and MDR phenotype, *exoU* and *exoS*-positive genotype, O4 and O11 serotypes and the ST175 high-risk clone. Thus, our results support and expand recent studies suggesting an association between resistance phenotype, high-risk clones and virulence [18, 20, 32] and represent a step forward in our understanding of the interplay between antibiotic resistance and virulence in *P. aeruginosa*.

There are some limitations in the present study. First, the relatively small number of strains affords a substantial chance for statistical bias and does not allow performing

alternative multivariate analyses; therefore, results should be taken cautiously, and larger strain cohorts are needed to validate our findings. In addition, the selection of isolates was intended to be representative of the clinical problem and so was based not only on the resistance phenotype but also on MLST, TTSS genotype and O-serotype (Table S1). In so doing, we have included more isolates of certain MDR/XDR profiles, which is consistent with their high-risk epidemiology. The inclusion of several isolates belonging to MDR clones ensured that there was as much variability as possible among these isolates and allowed a more robust statistical analysis. Second, the absence of whole genome sequencing and transcriptomic studies did not allow us to identify other underlying mechanisms responsible for the different pathogenic characteristics and gene expression variability among strains. Finally, we did not use isogenic mutants, a strategy that would have allowed us to study the impact of each virulence determinant on pathogenicity. Nevertheless, the characterization of the pathogenicity of *P. aeruginosa* causing bacteraemia presented in this study is a necessary step before

Table 1 Correlation between experimental studies

Variable	Non-virulent (CEVS 1-2 [n = 7])	Virulent (CEVS 3-5 [n = 31])	P value
<i>P. aeruginosa</i> phenotype			
Non-MDR	0	17 (54.8)	0.011
MDR	7 (100)	14 (45.2)	0.011
MLST			
ST175	5 (71.4)	0	<0.0001
ST235	0	12 (38.7)	0.075
O serotype			
O1	1 (14.3)	6 (19.4)	1.000
O4	5 (71.4)	0	<0.0001
O11	0	14 (45.2)	0.033
TTSS genotype			
<i>exoU</i> / <i>exoS</i> +	7 (100)	6 (19.4)	0.0001
<i>exoU</i> +/ <i>exoS</i>	0	21 (67.7)	0.002
Cytotoxicity assay (mean ± SD) ^a	11.5 ± 2.31	46.1 ± 17.28	<0.0001

MDR, multidrug-resistant; MLST, multilocus sequence typing; TTSS, type III secretion system; CEVS, *Caenorhabditis elegans* virulence scoring

^a The percentage of cell lysis was calculated relative to the value for the maximum LDH release control (cells lysed with an 1% solution of Triton X-100) following the manufacturer's instructions

proceeding to more sophisticated models to further understand the pathogenesis of this infection.

In summary, although our results suggest the existence of a fitness cost associated with multidrug resistance, the pathogenic characteristics of the ST235 high-risk clone are not only the result of the resistance phenotype but also the virulence genotype. Although not fully specific for the ST235 clone, the *exoU* gene was recovered in all ST235 strains. Our data suggest therefore that production of ExoU could play a part in the virulence of the ST235 clone. Hence, the high prevalence of this high-risk clone may have determined the significantly higher impact of MDR/XDR strains in mortality observed in our patients. These findings may be useful for the clinical management of patients and for infection control programmes.

Acknowledgements We are thankful to María Dolores Folgueira and Fátima Lasala (Department of Clinical Microbiology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain) for their guidance on performing the cytotoxicity assay. We are also grateful to Janet Dawson for revising the English manuscript.

Funding information This work was supported by Plan Nacional de I+D+i 2013–2016, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016) and cofinanced by European Development

Regional Fund “A way to achieve Europe”. Esther Viedma was also supported by “Juan Rodés” fellowship grant (Instituto de Salud Carlos III). Raúl Recio received a SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) mobility fellowship to support his work in the microbiology laboratory (IdISBa).

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This study was approved by the Research Ethics Committee of our centre (Health Research Institute, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain) [ref. TP17/0041].

References

- Kang CI, Kim SH, Kim HB, Park SW, Choe YJ, Oh MD et al (2003) *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. Clin Infect Dis 37(6):745–751
- Thaden JT, Park LP, Maskarinec SA, Ruffin F, Fowler VG, van Duin D (2017) Results from a 13-year prospective cohort study show increased mortality caused by *Pseudomonas aeruginosa* compared to other bacteria. Antimicrob Agents Chemother 61(6):1–11
- Kang C, Kim S, Park WB, Kim H, Kim E, Oh M et al (2005) Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. antimicrob agents chemother 2005;49 (2):760–6.
- Tam VH, Rogers CA, Chang KT, Weston JS, Caciop JP, Garey KW (2010) Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia on patient outcomes. Antimicrob Agents Chemother 54(9):3717–3722
- Suárez C, Peña C, Gavaldà L, Tubau F, Manzur A, Domínguez MA et al (2010) Influence of carbapenem resistance on mortality and the dynamics of mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. Int J Infect Dis 14(3):73–78
- Joo E-J, Kang C-I, Ha YE, Kang S-J, Park SY, Chung DR et al (2011) Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: clinical impact of antimicrobial resistance on outcome. Microb Drug Resist 17(2):305–312
- Peña C, Suarez C, Gozalo M, Munillas J, Almirante B, Pomar V et al (2012) Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. Antimicrob Agents Chemother 56(3):1265–1272
- Livermore DM (2009) Has the era of untreatable infections arrived? J Antimicrob Chemother 64 (suppl 1):29–36.
- Mesáros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y et al (2007) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clin Microbiol Infect 13(6):560–578
- Del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Cabot G, Rivera A, Benito N, Segura C et al (2017) Genomics and susceptibility profiles of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spain. Antimicrob Agents Chemother 61(11):e01589–e01517
- Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C (2015) The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Drug Resist Updat 21–22:41–59
- Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F et al (2012) Genetic markers of widespread extensively

- drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Antimicrob Agents Chemother 56(12):6349–6357
13. Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Zamorano L, Juan C et al (2013) Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. Antimicrob Agents Chemother 57(11):5527–5535
 14. Treepong P, Kos VN, Guyeux C, Blanc DS, Bertrand X, Valot B et al (2018) Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. Clin Microbiol Infect 24(3):258–260
 15. Hauser AR (2009) The Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. Nat Rev Microbiol 7(9):654–665
 16. Lu Q, Eggimann P, Luyt C-E, Wolff M, Tamm M, François B et al (2014) *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. Crit Care 18(1):R17
 17. El-Solh AA, Hattemer A, Hauser AR, Alhajhusain A, Vora H (2012) Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. Crit Care Med 40(4):1157–1163
 18. Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J et al (2015) Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. Clin Infect Dis 60(4):539–548
 19. Recio R, Villa J, Viedma E, Orellana MA, Lora-Tamayo J, Chaves F (2018) Bacteraemia due to extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 high-risk clone: facing the perfect storm. Int J Antimicrob Agents 52(2):172–179
 20. Gómez-Zorrilla S, Juan C, Cabot G, Camoez M, Tubau F, Oliver A et al (2016) Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro and in vivo studies. Int J Antimicrob Agents 47(5):368–374
 21. Abdelmaouf K, Kabbara S, Ledesma KR, Poole K, Tam VH (2011) Effect of multidrug resistance-conferring mutations on the fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 66(6):1311–1317
 22. Andersson DI, Hughes D (2010) Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? Nat Rev Microbiol 8(4):260–271
 23. Zur Wiesch PS, Engelstädter J, Bonhoeffer S (2010) Compensation of fitness costs and reversibility of antibiotic resistance mutations. Antimicrob Agents Chemother 54(5):2085–2095
 24. Recio R, Villa J, Viedma E, Orellana MA, Lora-Tamayo J, Chaves F (2018) El genotipo de virulencia *exoU* como predictor de mortalidad en bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa*. In: XXII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Bilbao, España, 2018. Abstract 0089. Enferm Infecc Microbiol Clin 36 Supl C1:S4.
 25. Magioranos AP, Srinivasan A, Carey RB, Cameli Y, Falagas ME, Giske CG et al (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 18(3):268–281
 26. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2018) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.1. Available: http://www.eucast.org/leadadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf.
 27. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH et al (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 33(9):2233–2239
 28. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG (2004) Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 42(12):5644–5649
 29. Feltman H, Jain M, Peterson L, Schult G, Khan S, Hauser AR (2001) Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 147: 2659–2669
 30. Liu PV, Wang S (1990) Three new major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 28(5):922–925
 31. Pérez-Gallego M, Torrens G, Castillo-Vera J, Moya B, Zamorano L, Cabot G et al (2016) Impact of AmpC derepression on fitness and virulence: the mechanism or the pathway? MBio 7(5):01783–01716
 32. Sánchez-Diener I, Zamorano L, López-Causapé C, Cabot G, Mulet X, Peña C et al (2017) Interplay among resistance profiles, high-risk clones, and virulence in the *Caenorhabditis elegans* *Pseudomonas aeruginosa* infection model. Antimicrob Agents Chemother 61(12):e01586–e01517
 33. Cabot G, Zamorano L, Moyà B, Juan C, Navas A, Blázquez J et al (2016) Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance and fitness under low and high mutation rates. Antimicrob Agents Chemother 60(3):1767–1778
 34. Viedma E, Juan C, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F et al (2009) Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum β -lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. Antimicrob Agents Chemother 53(11):4930–4933
 35. Viedma E, Juan C, Villa J, Barnado L, Ángeles Orellana M, Sanz F et al (2012) VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone, Spain. Emerg Infect Dis 18(8):1235–1241
 36. Miyoshi-Akiyama T, Tada T, Ohmagari N, Viet Hung N, Tharavichitkul P, Pokhrel BM et al (2017) Emergence and spread of epidemic multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Genome Biol Evol 9(12):3238–3245
 37. Howell HA, Logan LK, Hauser AR (2013) Type III secretion of *ExoU* is critical during early *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. MBio 4(2):e00032–e00013
 38. Faure K, Shimabukuro D, Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, Wiener-Kronish JP (2003) O-antigen serotypes and type III secretory toxins in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 41(5):2158–2160

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Anexo 2. Formularios de recogida de datos de los estudios

Episodio

► Episodio Siglas Sexo Frac

Antecedentes (Charlson)

Infarto de miocardio

Insuf. cardíaca

Enf. arterial perf.

Enf. cerebro-vascular

Demencia

Enf. respiratoria crónica

Coronariopatía

Úlcera péptica

Diabetes mellitus

Enfermedad hepática

Enf. renal crónica (2)

Neoplasia sólida

Leucemia/Sd MielóProlif

Linfoma / MM / V&adistrom

SIDA (por criterios dx)

Tratamiento inmunosupr.

Neutropenia <500 cels/uL

Trasplante órgano sólido

Fecha bacteriemia

Fecha de ingreso

Adquisición

Origen bacteriem

Bacteriemia polimicrobiana

Micro

Micro

Presentación clínica

Temperatura (°C)

Frec. cardíaca

Frec. resp

HipoTA^{***}

Conciencia

Drogas vasoact

Vent. mecánica

Parada cardíaca

Instrumentación previa durante el presente ingreso

Coloniz. misma PA

Tratamiento previo con...

Cefalosporinas

Pip/Tazo

Carbapenems

Quinolonas

Aminoglucósidos

Colistina

Otros ATB

Coléter vascular

Sonda urinaria

Ventilación mec.

Ingreso en UCI

Crugía

Leucocitos (cels/uL)

Plaquetas (cels/uL)

Prot. C Reactiva

Pro-calcitonina (ng/mL)

pCO2 (mmHg)

Lactato (mmol/L)

Tratamiento del foco

Nota: Cardia > 30 mmHg TA sist y > 20 mmHg TA diast
· o TA sistólica < 90 mmHg
· o necesidad drogas vasoactivas

Outcome

Muerte

Atribuible

Fecha muerte

Alta?

Fecha de alta

Combinación 1 2 3 4 Rol ATB Fecha inicio Fecha fin Comentario

Registro: 14 1 de 1 Sin filtro Buscar

	A	B	C	D	E	F	G	H
1			0	24		72		168
2	Cepas	Réplicas	Vivos	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos
3		1						
4		2						
5		3						
6	Mean							
7		1						
8		2						
9		3						
10	Mean							
11		1						
12		2						
13		3						
14	Mean							
15		1						
16		2						
17		3						
18	Mean							
19		1						
20		2						
21		3						
22	Mean							
23		1						
24		2						
25		3						
26	Mean							
27		1						
28		2						
29		3						
30	Mean							
31		1						
32		2						
33		3						
34	Mean							
35		1						
36		2						
37		3						

Anexo 3. Informe favorable de la Comisión de Investigación

TP17/0041

INFORME DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN

La Comisión de investigación del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12) ha valorado el protocolo de investigación:

Título: "Influencia del genotipo de virulencia y perfil de resistencia en la evolución clínica de pacientes con bacteriemia secundaria a *Pseudomonas aeruginosa*".

Investigador Principal: Dr. Fernando Chaves Sánchez.

y considera que reúne todos los requisitos necesarios en cuanto a calidad científica, viabilidad y adecuación para ser realizado dentro de las líneas de investigación del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, no precisando la aprobación de un Comité de Ética de la Investigación, dado el ámbito de la investigación a desarrollar y de acuerdo a la normativa vigente.

Para que así conste, firma en Madrid, a 03 de febrero de 2017.


Fdo.: Dr. Joaquín Arenas Barbero
Presidente de la Comisión de la Investigación

